

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

DPTO. PRODUCCIÓN VEGETAL: FITOTECNIA

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID



Trabajo Fin de Carrera:

**Cultivo de microalgas (*Chlorella sorokiniana*) con iluminación
mediante LEDs (*Light Emitting Diodes*)**



Autor:

Juan Plasencia Álvarez

Tutor:

José María Durán Altisent

Madrid, Octubre 2012

No es el amor o el dinero lo que mueve el mundo, es la fotosíntesis.

- *Handbook of Microalgal Culture.*

ABREVIATURAS

X_M	Valor máximo de densidad óptica de las cinco experiencias
X_{ft}	Densidad óptica al final del ciclo del testigo
X_i	Densidad óptica de partida
X_m	Valor mínimo de densidad óptica de las cinco experiencias
μ_r	Crecimiento relativo al máximo
μ_t	Tasa de crecimiento relativo al testigo
18/6	Fotoperiodo, 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad
c	Velocidad de la luz en el vacío: $3 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$
CE	Conductividad eléctrica ($\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$)
<i>Chl a</i>	Clorofila a
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido Etilen Diamino Tetraacético
EEUU	Estados Unidos de América
ETSIA	Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
GA	Grupo de Agroenergética
h	Constante de Planck, $h = 6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ Js}^{-1}$
li	Intensidad lumínica de inhibición
Ik	Intensidad lumínica de saturación
IR	Infrarojo, Radiación Infraroja
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
PAR	<i>Photosynthetically Active Radiation</i>
PBR	Photobioreactor
PFD	<i>Photosynthetic Flux Density</i>
pH	Concentración de protones (0 - 14)
Pmax	Tasa fotosintética máxima
R ²	Coefficiente de correlación (0 - 1)
Rd	Respiración oscura
T	Periodo (s)
UPM	Universidad Politécnica de Madrid
UV	Ultravioleta, Radiación Ultravioleta
α	Eficiencia fotosintética
λ	Longitud de onda (nm)
ν	Frecuencia (s^{-1})
γ	<i>Gamma</i> , Radiación Gamma

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Producción Vegetal: Fitotecnia por la posibilidad de realizar este Trabajo Fin de Carrera.

Al Grupo de Agroenergética por facilitarme todo lo necesario para realizar este trabajo, tanto materiales como conocimiento, así como ideas, ánimos y buenos momentos. Particularmente a Maribel, Blanca y Albert sin los que no hubiera sido posible llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. José María Durán Altisent, por su paciencia y apoyo a lo largo de estos meses, su disponibilidad para cualquier duda y su pasión por el desarrollo de nuevas tecnologías.

Al Dr. Jesús Fernández González, por sus consejos y su interés, y por saber transmitir su entusiasmo por lo que realiza a todo el que le rodea.

A la familia, los amigos y todo aquel que en algún momento me preguntó: ¿Cómo van esas algas?

A Maje por apoyarme, aconsejarme y entender la prioridad que en algunos momentos tenían estos organismos fotosintéticos.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 . Antecedentes	2
1.2 . Revisión bibliográfica	2
1.2.1. Microalgas.	2
1.2.2. Antecedentes históricos.....	3
1.2.3. Parámetros de cultivo.	4
1.2.4. Sistemas de producción.....	14
1.3. Objetivos.	19
 2. Material y Métodos	21
2.1. Material vegetal	22
2.1.1. Preparación y mantenimiento del inóculo.....	22
2.2. Medio de cultivo.....	22
2.2.1. Preparación de las experiencias.....	22
2.2.2. Calefacción y control de temperatura.....	23
2.2.3. Aireación del medio.....	25
2.3. Plataforma para el ensayo	25
2.3.1. Evaluación cualitativa y cuantitativa de la luz empleada.....	27
2.4. Evolución de variables diarias.....	29
2.4.1. Medida de densidad óptica (DO).....	29
2.4.2. Medida de pH, conductividad eléctrica (CE) y temperatura.....	29
2.4.3. Medida del contenido de nutrientes.....	30
 3. Resultados y Discusión	32
3.1. Primera experiencia, luz roja al cincuenta por ciento de intensidad.....	33
3.2. Segunda experiencia, luz azul cincuenta por ciento de intensidad.....	35
3.3. Tercera experiencia, luz roja cincuenta por ciento y luz azul cincuenta por ciento de intensidad.....	36
3.4. Cuarta experiencia, luz roja setenta por ciento y luz azul treinta por ciento de intensidad.....	38
3.5. Quinta experiencia, luz roja treinta por ciento y luz azul setenta por ciento de intensidad.....	40
3.6. Comparación del crecimiento semanal.....	46
3.6.1. Crecimiento relativo al testigo.....	46
3.6.2. Crecimiento relativo al máximo.....	47
3.7 Relación entre la evolución de la densidad óptica y los distintos parámetros evaluados (pH y CE)....	50

3.7.1. Densidad óptica y pH.....	50
3.7.2. Densidad óptica y Conductividad Eléctrica (CE).....	52
3.8. Evaluación del contenido de nutrientes con el equipo CleanGrow.....	53
3.9. Evaluación de la Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR).....	53
3.9.1. Evaluación de la PAR en función de la distancia y la posición del sensor plano, para diferentes intensidades de los LEDs.....	54
3.9.2. Evaluación de la PAR en función de la distancia del sensor plano cuando se encuentra sumergido en el cono de cultivo, para diferentes intensidades de los LEDs.....	57
3.9.3. Evaluación de la PAR en función de la posición dentro del cono y la distancia al foco con un sensor esférico sumergible.....	60
3.9.4. Evaluación de la PAR en función de la densidad óptica del cultivo y del diámetro del recipiente, para distintos niveles de intensidad de los LEDs.....	64
4. Conclusiones	72
5. Bibliografía	75
ANEXOS	82
Anexo I. Evaluación de los espectros de emisión de distintas fuentes de luz.....	I.1
Anexo II. Relación entre la densidad óptica y el peso seco de la biomasa obtenida.....	II.1

RESUMEN

Con el fin de establecer si es posible llevar a cabo el cultivo de microalgas empleando LEDs (*Light Emitting Diodes*) y si el empleo de los mismos supone alguna ventaja, se llevaron a cabo cinco experiencias con el microalga *Chlorella sorokiniana* en las que se varió la cantidad y la calidad de la luz aplicada. En las dos primeras experiencias se empleó luz de un solo color, roja en la primera y azul en la segunda, ambas al 50 % de su intensidad. En las tres siguientes se ensayaron mezclas de ambas, aplicando en la tercera 50 % de luz roja y 50 % de luz azul, en la cuarta 70 % de luz roja y 30 % de luz azul y en la quinta 30 % luz roja y 70 % luz azul. En todos los casos se llevó a cabo simultáneamente el cultivo de un testigo en las mismas condiciones pero iluminado con una lámpara fluorescente. Diariamente se tomaron medidas de la densidad óptica, el pH y la conductividad eléctrica. El seguimiento de la temperatura se hizo por medio de sensores que tomaron muestras cada 60 segundos. La experiencia en la que se empleó luz roja y azul al 50 % de intensidad presentó las mayores diferencias con respecto al testigo. En el resto de los casos el ensayo y el testigo presentaron crecimientos similares. Además se evaluaron varias fuentes de luz de uso frecuente en laboratorio con el fin de conocer su espectro de emisión y su comportamiento al atravesar el medio de cultivo.

SUMMARY

Trying to set if it's possible to perform the microalgal culture using LEDs (*Light Emitting Diodes*) and if their use gives any advantages, five experiences with microalgae *Chlorella sorokiniana* were carried out varying the quantity and quality of the light applied. In the first two experiences monochromatic light was employed, red in the first one and blue in the second, both of them applied with 50 % intensity. In the next three experiences mixtures of both were essayed applying 50% of red and 50% of blue light, the fourth 70% red and 30% blue light and the fifth 30% red and 70% blue light. In all cases took place simultaneously the cultivation of a control under the same conditions but illuminated with a fluorescent lamp. Daily measurements were taken of optical density, pH and electrical conductivity. The monitoring of the temperature was made by sensors taking samples every 60 seconds. The experience using red and blue light at 50% intensity presented the major differences compared to the control. In the other cases test and control showed similar growth. Also were evaluated several light sources commonly used in laboratory to find out its emission spectrum and their behaviour through the culture medium.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES.

El conocimiento desarrollado en el Departamento de Producción Vegetal: Fitotecnia, en el cultivo de hortalizas empleando LEDs sirvió como punto de partida para plantear la fusión de la aplicación de esta tecnología a la producción de microalgas. El interés por la producción de microalgas se debe a su utilidad como cultivo alternativo para la producción de biomasa.

1.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Es extensa la bibliografía existente en relación con el tema de producción de microalgas para diversos fines (Fig. 1). La revisión llevada a cabo se centra principalmente en el origen y aplicaciones del cultivo, los parámetros de producción y por último en algunas características de los sistemas de producción.

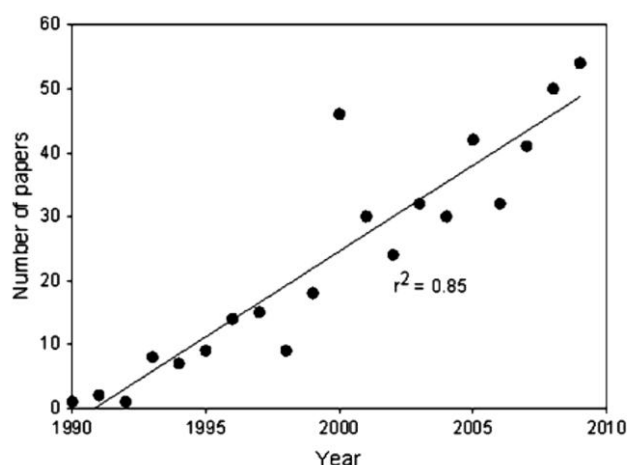


Fig. 1. Aumento del número de *papers* publicados por año que tratan temas relacionados con el diseño y la mejora de fotobiorreactores en las principales revistas de biotecnología microalgal (Grobelaar, 2010).

1.2.1. MICROALGAS.

Las microalgas se encuentran en la naturaleza prácticamente en cualquier ambiente debido a su elevada biodiversidad y a la versatilidad fisiológica de la que hacen gala (Pulz, 2001). Dentro del término microalgas se incluyen todos los microorganismos que contienen clorofila *a* y otros pigmentos fotosintéticos y son capaces de realizar fotosíntesis oxigénica (Abalde, et al., 1995). Por ello el término microalgas engloba tanto organismos eucariotas como cianobacterias procariotas, como es el caso de la microalga *Spirulina* de gran importancia en el sector.

Las microalgas eucariotas son unicelulares y presentan gran variedad de formas y tamaños, así como de organización intracelular (Abalde, et al., 1995). Contienen las estructuras y orgánulos característicos de una célula eucariota y además, algunas de ellas presentan orgánulos característicos: el pirenoide y la mancha ocular. El pirenoide, de naturaleza proteica, está asociado al cloroplasto; y la mancha ocular, compuesta por glóbulos lipídicos, se presenta en muchas microalgas flageladas (Tomaselli, 2004).

Las microalgas procariotas tienen una organización más simple que las eucariotas. Pueden presentarse individualmente pero es más frecuente que estén asociadas en estructuras filamentosas (Abalde, et al., 1995). En general las microalgas se pueden presentar libres en su medio o bien asociadas simbióticamente con otros organismos (Tomaselli, 2004).

El interés en el cultivo de microalgas es debido principalmente a que por su simplicidad presentan la mayor eficiencia en transformación de la energía solar. Las plantas tienen una eficiencia menor por tener que hacer frente a la producción y mantenimiento de unas estructuras que no se dan en las microalgas. Las ventajas sobre las plantas se basan por tanto en una mayor eficiencia fotosintética debido a la falta de competencia entre funciones fisiológicas, ciclos de reproducción más rápidos, menores requerimientos nutricionales y facilidad de adaptación a diferentes situaciones ambientales (Gordon & Polle, 2007; Carvalho, et al., 2011).

Esta relativa facilidad para transformar la energía solar en biomasa hace que sea interesante la producción en masa para su transformación en comida, cosméticos, productos de interés para la industria química y farmacéutica, alimentación animal y en sistemas de acuicultura, tratamiento de aguas residuales, biorremediación en contaminación por metales pesados y más recientemente como biocombustibles, jugando un importante papel en la captura de CO₂ (Pulz, 2001; Oilgae, 2011)

1.2.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

Las primeras referencias sobre cultivos puros de microalgas datan de 1890 (Beijerinck, 1890), cuando se consiguió aislar y definir el microalga *Chlorella vulgaris*. A principios del siglo XX Otto Warburg (1883-1970) comienza a emplear cultivos de microalgas para el estudio de la fotosíntesis (Nickelsen, 2007; Grobbelaar, 2010). Durante la Segunda Guerra Mundial se llevó a cabo la producción de microalgas para generar biomasa lipídica que pudiera utilizarse como proteína (Harder & Von Witsch, 1942).

Durante los años 50 del pasado siglo se llevaron a cabo importantes trabajos en aras de la producción a gran escala. En 1953 se comenzó a experimentar el cultivo a gran escala al aire libre y en invernadero en la ciudad de Essen, al oeste de Alemania (Gummert, et al., 1953) aprovechando las grandes cantidades de CO₂ producidas en la industria de la zona. Prácticamente al mismo tiempo se desarrollaron otros prototipos con el mismo objetivo en otras partes del mundo como Tokio, Japón (Mitsuya, et al., 1953), Stanford, EE.UU (Arthur D. Little, Inc., 1953), Israel (Evenari, et al., 1953), Trebon, República Checa (Masojidek & Prášil, 2010), entre otros. La institución *Carnegie of Washington* recopiló todos estos trabajos y añadió algunos más elaborados en la institución en una publicación pionera que sentaba las bases científicas de la producción de microalgas (Burlew, 1953).

Se comienza a pensar en las microalgas como solución parcial a los problemas de carencias proteínicas del mundo debido al elevado contenido en proteína bruta de las mismas, hasta el 50% (Fisher Jr. & Burlew, 1953; Milner, 1953). Durante este periodo se incrementaron los conocimientos sobre rendimiento, composición química, fijación de nitrógeno, posibilidades de *scale-up*, entre otros conocimientos, de cultivos de microalgas (Abalde, et al., 1995). De este modo se descubrió que desde hace siglos se han consumido localmente microalgas como fuentes de vitaminas y proteínas: *Spirulina maxima* era consumida por los aztecas y por los nativos del Chad; distintas especies del género *Nostoc* se comercializan y consumen en Mongolia, Tartaria, China, Ecuador, Fiji, Okinawa, Tailandia y los Andes peruanos; *Phyllocladon sacrum* considerada un manjar en Japón; *Oedogonium* y *Spirogyra* se consumen y comercializan en Vietnam e India, y *Prasiola yunnanica* y *Prasiola japonica* se consumen frecuentemente en China y Japón, respectivamente por su altísimo contenido en proteínas (Abalde, et al., 1995; Pulz & Scheibnbogen, 1998; Spolaore, et al., 2006; Grobbelaar, 2010).

Asimismo se fueron desarrollando iniciativas para emplear el cultivo masivo de microalgas en el tratamiento de aguas residuales y la producción simultánea de proteínas (Abalde, et al., 1995), así como la conversión de la energía de la radiación solar en energía química produciendo metano por fermentación (Golueke & Oswald, 1959).

La carrera espacial también se interesó por la producción de microalgas. Se comenzaron a desarrollar sistemas para regeneración de oxígeno empleando microalgas por su alta capacidad de adaptación a situaciones de estrés (Abalde, et al., 1995; Lee & Palsson, 1995; Hao, et al., 2011)

A partir de los años 60 comenzaron a establecerse las primeras explotaciones comerciales de microalgas. La primera explotación se instaló en Tokio, Japón en 1961 por Nihon Chlorella Inc. para el cultivo de *Chlorella*. Con el paso del tiempo se ha generado un importante mercado entorno al microalga con presentaciones en forma de tableta, extractos y otros complementos alimenticios. Esto ha supuesto el desarrollo de una floreciente industria de productos saludables tanto en Japón como en Taiwán, Malasia e Indonesia durante los últimos 40 años (Abalde, et al., 1995; Iwamoto, 2004). En México la industria Sosa Texcoco S.A. comenzó la producción de *Spirulina* en el lago Texcoco en 1973.

Durante la crisis del petróleo de los años 70 la producción de microalgas ofreció una nueva vuelta de tuerca y se comenzó a investigar su papel como materia prima en energías renovables (Spolaore, et al., 2006).

A partir de los años 80 se produjo la instalación de plantas de producción a gran escala en Asia, Australia, EE.UU, Israel e India principalmente. Se producen sobre todo complementos alimenticios tanto para el ser humano como para alimentación animal, productos empleados en cosmética, moléculas de alto valor añadido como ácidos grasos, pigmentos e isótopos bioquímicos estables (Spolaore, et al., 2006; Mata, et al., 2010; Harun, et al., 2010).

Así mismo se fue desarrollando una industria de producción de microalgas presentes en hábitats marinos para atender las necesidades de la creciente industria de acuicultura marina. Se precisan grandes cantidades de microalgas para la alimentación de larvas de crustáceos, moluscos y peces, así como zooplancton (Coutteau, 1996; Borowitzka, 1997; Brown, et al., 1997; Mata, et al., 2010).

Por último, la producción de microalgas se está empleando como base para energías renovables en la producción de biocombustibles: biodiesel, bioetanol y bioqueroseno entre otros (Abalde, et al., 1995; Gordon & Polle, 2007; Morweiser, et al., 2010; Harun, et al., 2010; Kunjapur & Eldridge, 2010; Mata, et al., 2010; Taberner, et al., 2011; Chen, et al., 2011; Zeng, et al., 2011; Suali & Sarbatly, 2012).

1.2.3. PARÁMETROS DE CULTIVO.

Las microalgas requieren para su correcto crecimiento una balance adecuado de diferentes nutrientes y condiciones ambientales. Los factores que más influyen en la producción son: Luz, temperatura, pH, salinidad, fuente de carbono, nutrientes del medio de cultivo, características del inóculo, agitación, evaporación y contaminación (Abalde, et al., 1995).

El éxito del cultivo se verá afectado por los niveles que haya de nutrientes y por las condiciones ambientales, así como el manejo de las mismas cuando sea posible. Es preciso conocer el rango de valores óptimos para cada parámetro y su interacción con los demás, ya que generalmente los niveles óptimos se definen en función de valores constantes de otro u otros parámetros.

1.2.3.1. LUZ.

La luz es el factor de producción más importante (Richmond & Qiang, 1997; Grobbelaar, 2009; Carvalho, et al., 2011), es considerado el nutriente limitante cuando se trata de cultivo de microorganismos fotosintéticos (Cuaresma, et al., 2011). El aporte, distribución y utilización de la luz es un aspecto de capital importancia en la producción de biomasa microalgal (Eriksen, 2008).

NATURALEZA DE LA LUZ

La luz es la fuente de energía primaria de la biosfera. La vida es posible gracias a los organismos fotosintéticos que transforman la energía lumínica proveniente de la radiación solar en energía química. La fotosíntesis consigue producir materia orgánica a partir CO_2 atmosférico desprendiendo O_2 mediante la fotólisis del agua. Gracias al proceso fotosintético, la atmósfera se fue enriqueciendo en oxígeno hasta alcanzar el nivel actual del 21 % (Fernández, 1982). Por otro lado la radiación proveniente del Sol se encarga de mantener la temperatura del planeta dentro de los rangos que la hacen habitable para el ser humano.

De toda la radiación solar que incide sobre la superficie terrestre aproximadamente un 40 % es radiación luminosa. Un 58 % de la radiación alcanza la superficie de la tierra en forma de radiación infrarroja (IR) aportando calor y el 2 % restante se reparte entre radiación ultravioleta (UV) y gamma (γ) (Azcón-Bieto & Talón, 2008).

La radiación lumínica es una onda electromagnética que se mueve a la velocidad de la luz, $c \sim 3 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ y se caracteriza por su frecuencia, ν , o por la inversa de la misma, el periodo (T). Según la teoría cuántica la energía asociada a la luz se distribuye en forma de paquetes discretos llamados fotones (o cuantos de luz). Estos fotones presentan distintos niveles de energía en función de su frecuencia. La energía asociada a un fotón se determina como el producto de su frecuencia y de la constante de Planck ($h = 6,6262 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$).

$$E = \frac{h}{T} = h\nu$$

La frecuencia y la longitud de onda están relacionadas por medio de la velocidad de la luz $c = \lambda \nu$, por lo que la ecuación anterior se puede ampliar a:

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

La energía y la longitud de onda están inversamente relacionadas por lo que un fotón de luz azul (430 - 500 nm) presenta mayor energía que un fotón de luz roja (600 - 680 nm). La radiación luminosa es aquella que está comprendida entre 380 y 750 nm (Fig. 2). Dentro de esta se engloba la radiación que tiene influencia en la fotosíntesis o Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR, del inglés *Photosynthetically Active Radiation*).

INTENSIDAD

La tasa fotosintética y la intensidad lumínica se relacionan por medio de una cinética de Michaelis-Menten (Fig. 3). La tasa fotosintética aumenta con la intensidad hasta el punto de saturación, que varía en función de la especie y las condiciones ambientales. A partir del punto de saturación lumínica la tasa fotosintética se mantiene constante hasta un nivel en el que empieza a descender.

A intensidades bajas el crecimiento está limitado por la falta de luz, en este punto la eficiencia en el aprovechamiento de la luz es muy alta, toda la luz incidente se aprovecha en la fotosíntesis. Las microalgas que se desarrollan a bajos niveles de intensidad lumínica presentan una cantidad mayor de pigmentos fotosintéticos por lo que son más eficientes en el aprovechamiento de la luz (Xue, et al., 2011).

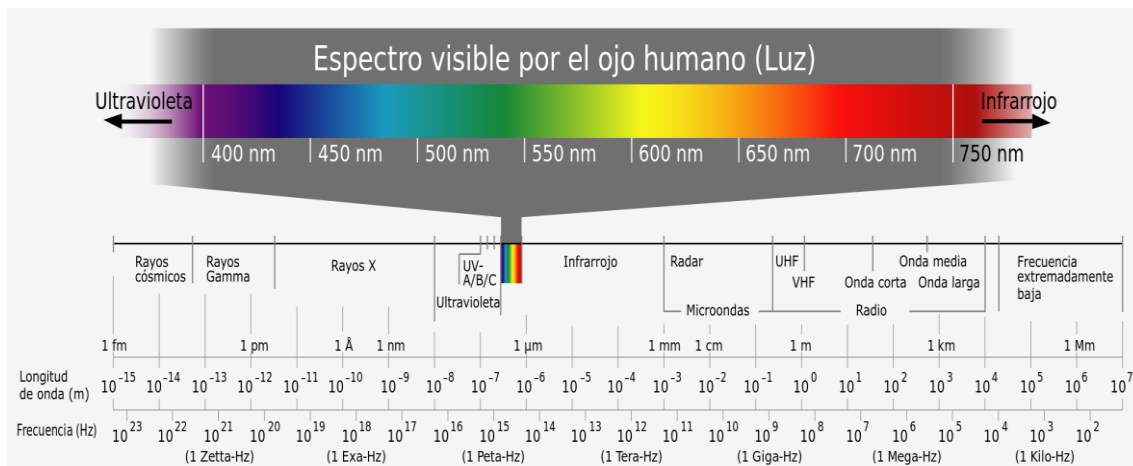


Fig. 2. Espectro electromagnético de la radiación solar y detalle del espectro visible. Fuente: WikiCommons. Autor: Horst Frank bajo licencia Creative Commons Genérica de Atribución/Compartir-Igual 3.0 - 2005.

A valores superiores de intensidad lumínica, las microalgas reciben más energía de la necesaria para la fotosíntesis, por lo que comienzan a disipar energía en forma de calor, lo que conlleva un descenso de la eficiencia (Abalde, et al., 1995; Grobbelaar, 2009; Grobbelaar, 2010). Las microalgas que se desarrollan en esta situación tienen su crecimiento limitado por otros parámetros como la capacidad de fijar CO_2 . Las células de este rango se caracterizan por tener menos clorofila por célula y presentar una tolerancia mayor a la fotoinhibición (Abalde, et al., 1995).

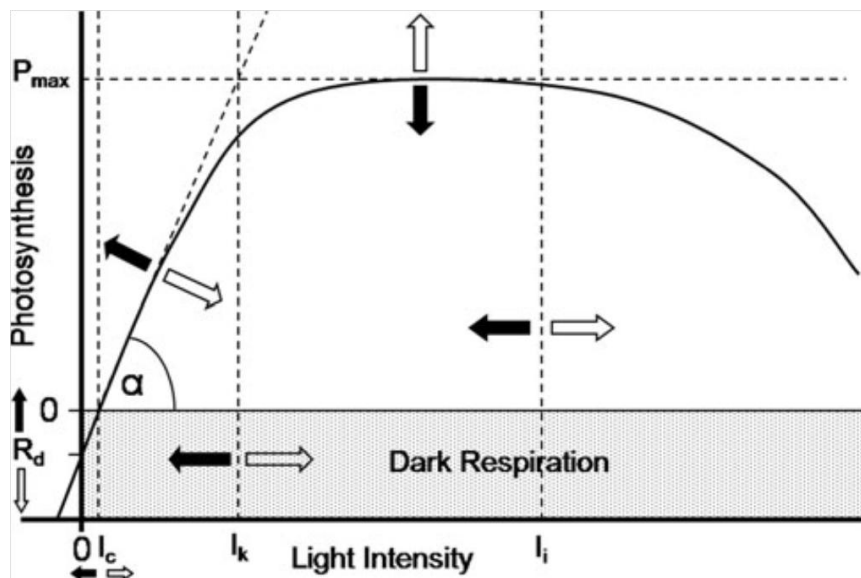


Fig. 3. Evolución de la tasa fotosintética en función de la intensidad lumínica. P_{max} hace referencia a la mayor tasa fotosintética, obtenida a saturación lumínica; R_d se corresponde con el valor de respiración oscura. El punto en el que la curva de respuesta fotosintética se cruza con el valor de respiración oscura se conoce como punto de compensación; α hace referencia a la eficiencia fotosintética; I_k , se corresponde con el valor de intensidad a partir del que se alcanza la saturación e I_i , a partir del que empieza la inhibición. Las flechas oscuras muestran la tendencia de la gráfica en el caso de fotoaclimatación a la oscuridad y las flechas blancas el caso de aclimatación a altas intensidades lumínicas (Grobbelaar, 2010).

Si los valores de intensidad superan el nivel de saturación, llega un punto en que la tasa fotosintética comienza a tomar valores negativos llegando a generarse daños en los cloroplastos (Carvalho, et al., 2011). Este fenómeno se conoce como fotoinhibición y conlleva daños irreparables a nivel del fotosistema II por síntesis de formas de oxígeno que dañan y oxidan los fotosistemas (Han, et al., 2000; Eriksen, 2008). La fotoinhibición no solo depende de la intensidad de luz sino que es dependiente de los demás factores que influyen en el cultivo. Así se ha reportado que con valores de temperatura próximos al óptimo del cultivo, las microalgas soportan intensidades mayores, y que se puede producir fotoinhibición a niveles de intensidad baja cuando la temperatura es también baja (Carvalho, et al., 2011). No hay consenso sobre los niveles de iluminación a los que se produce el fenómeno de fotoinhibición porque el mismo está muy influenciado por los factores ambientales en los que se desarrolla el cultivo. En condiciones de laboratorio se trabaja con niveles de fotoinhibición que oscilan entre 200 y 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, pero en la naturaleza se alcanzan valores de aproximadamente 2000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ en las horas centrales del día, en una zona como España (Gordon & Polle, 2007). Recientemente se está trabajando con valores muy superiores de irradiancia, aplicados en pulsos de luz y con unas condiciones concretas de agitación, alcanzando valores de 4000 a 8000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Richmond & Qiang, 1997; Qiang, et al., 1998), incluso proponiendo que se pueden aplicar 10000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Gordon & Polle, 2007).

CALIDAD (LONGITUD DE ONDA)

La utilidad principal de los fotones, al hablar de fotosíntesis, radica en utilizar su energía para desencadenar una reacción física o química, para lo que es necesario que este interactúe con una molécula capaz de absorberlo. Es un fotón individual el que interactúa con la molécula, y no se puede fraccionar. La energía asociada a cada fotón pasa a la molécula que alcanza un nivel energético superior, conocido como estado de excitación. Solo se dan ciertos niveles energéticos en una molécula, un fotón solo puede ser absorbido por una molécula que disponga de niveles cuyas diferencias energéticas sean iguales a las del fotón absorbido (Barceló-Coll, et al., 2001).

Los estados de excitación son muy inestables por lo que una vez alcanzados los electrones bajan a niveles de menor energía o directamente al estado fundamental cediendo energía. Esta pérdida de nivel energético se puede producir por (De la Rosa, et al., 1990):

- Pérdida de energía en forma de calor, radiación de longitud de onda superior a 750 nm.
- Pérdida de energía como fluorescencia: la energía se cede emitiendo en una longitud de onda ligeramente superior a 660 nm.
- Participación en procesos fotoquímicos: la energía se cede a otra molécula que se encuentre lo suficientemente cerca por resonancia. De este modo se transmite la energía en las antenas fotosintéticas.

Las moléculas que absorben estos fotones son los pigmentos fotosintéticos. Los pigmentos son moléculas cromóforas sensibles a la radiación luminosa que se encuentran asociadas a proteínas conformando lo que se conoce como complejos pigmento-proteína (Azcón-Bieto & Talón, 2008). Para que se produzca la absorción de los fotones por parte de los pigmentos es necesario que el espectro de acción de los fotones coincida, al menos en parte, con el de absorción de los pigmentos. Las clorofilas son los pigmentos más importantes, su espectro de absorción (Fig. 4) presenta máximos en las zonas correspondientes al azul (430 - 500 nm) y al rojo (600 - 680 nm). Las clorofilas solo absorben en estas dos regiones y reflejan el verde. Es por ello que las partes de las plantas donde hay concentración alta de clorofila se ven verdes, como las hojas y los tallos jóvenes.

Existen varios tipos de clorofilas: *a*, *b*, *c* y *d*. La clorofila *a* se encuentra presente en todos los organismos fotoautótrofos oxigénicos formando parte del núcleo y del centro de reacción del complejo pigmento-proteína (Masojídek, et al., 2004). Las clorofilas *b*, *c* y *d* funcionan principalmente como pigmentos accesorios formando parte de las antenas colectoras de energía, y no se encuentran en todos los organismos fotosintéticos. Cumplen la función de aumentar el rango de absorción.

Otro grupo de pigmentos importante son los carotenoides que absorben entre 400 y 550 nm. Dentro de este grupo se encuentran los carotenos (α -carotenos, β -carotenos) y las xantofilas (luteína, violaxantina, zeaxantina, entre otros carotenoides). Los carotenoides tienen tres funciones principalmente: son pigmentos accesorios que transfieren la excitación a la clorofila *a*, forman parte de los centros de reacción en los complejos pigmentos-proteína y son moléculas protectoras contra los excesos de irradiancia mediante procesos que disipan y extinguen la energía.

La combinación de estos pigmentos y sus relaciones entre ellos y con proteínas hacen que el espectro de absorción sea mayor que el correspondiente únicamente a la clorofila y de este modo el número de fotones de radiación visible que se pueden absorber es superior ya que las zonas de absorción se amplían un poco en el verde.

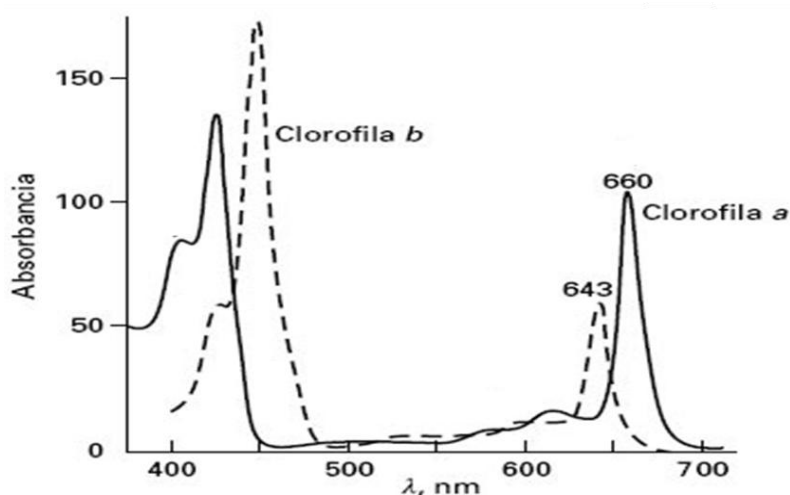


Fig. 4. Espectro de absorción de las clorofilas *a* y *b*. Los picos de absorción se corresponden con las regiones del azul y del rojo. Fuente: Azcón-Bieto & Talón, 2008.

Como se ha visto anteriormente la incidencia de un fotón en la molécula de clorofila eleva un electrón a un nivel energético superior. En función de la longitud de onda, el fotón aporta una energía determinada (Tabla 1). Las radiaciones provenientes de la región del azul excitan al electrón de la clorofila a un nivel con una energía de 278 kJ/mol de fotones. Este nivel es considerado el nivel 1 y se caracteriza por ser muy inestable (10^{-12} s), por lo que el electrón volverá al estado fundamental cediendo la energía adquirida (Barceló-Coll, et al., 2001).

La radiación proveniente de la región del rojo aporta al electrón una energía menor que en el caso anterior. Alcanza el nivel 2, con una energía de 181 kJ/mol de fotones. A este nivel energético se puede llegar por la excitación pertinente o bien desde el nivel 1 por pérdida de energía en forma de calor. Presenta una estabilidad superior a la del nivel 1, (10^{-9} s). Desde este nivel se puede pasar a otro nivel energéticamente inferior y por ello más estable, el nivel 3 (170 kJ/mol de fotones), el cual se puede alcanzar aplicando la iluminación adecuada con una longitud de onda de alrededor de 695 nm. Este

tercer nivel presenta la estabilidad necesaria para que el electrón excitado de la clorofila interactúe con otras moléculas (Whatley & Whatley, 1983; De la Rosa, et al., 1990; Barceló-Coll, et al., 2001).

Se puede producir el paso del nivel 3 al estado fundamental por emisión de fluorescencia o bien pasar al nivel 4 por variación del spin formando un triplete. Aunque este último nivel es muy estable (10^{-4} s), el paso de uno a otro es poco frecuente. Desde este cuarto nivel se pasa al estado fundamental por emisión de fosforescencia. Debido a que el electrón excitado con luz azul permanece muy poco tiempo en el estado de mayor excitación y cae al singulete uno, se considera que un fotón de luz azul y uno de luz roja tienen la misma energía útil fotoquímica (Whatley & Whatley, 1983), teniendo la luz roja por tanto, mayor rendimiento energético que la luz azul (Barceló-Coll, et al., 2001).

El número de fotones empleados en la fotosíntesis se pueden calcular como la energía requerida para fijar un átomo de carbono como una molécula de HCOH. De este modo se conoce que son necesarios ocho fotones para fijar un mol de carbono (Hill, 1965). La afirmación del número exacto de fotones necesarios para la fijación de un mol de carbono es un tema que genera controversia desde que se planteó (Weyer, et al., 2010), se acepta generalmente la cifra de 8 fotones (Grobelaar, 2010) pero algunos autores afirman que son necesarios entre 6 y 16 (Pulz & Scheibebogen, 1998; Melis, 2009). A pesar de que no haya consenso en el número de fotones necesarios, no se debe incurrir en el error de confundir la energía asociada a cada fotón con el número de fotones necesarios como se plantea en algunos trabajos (Das, et al., 2011).

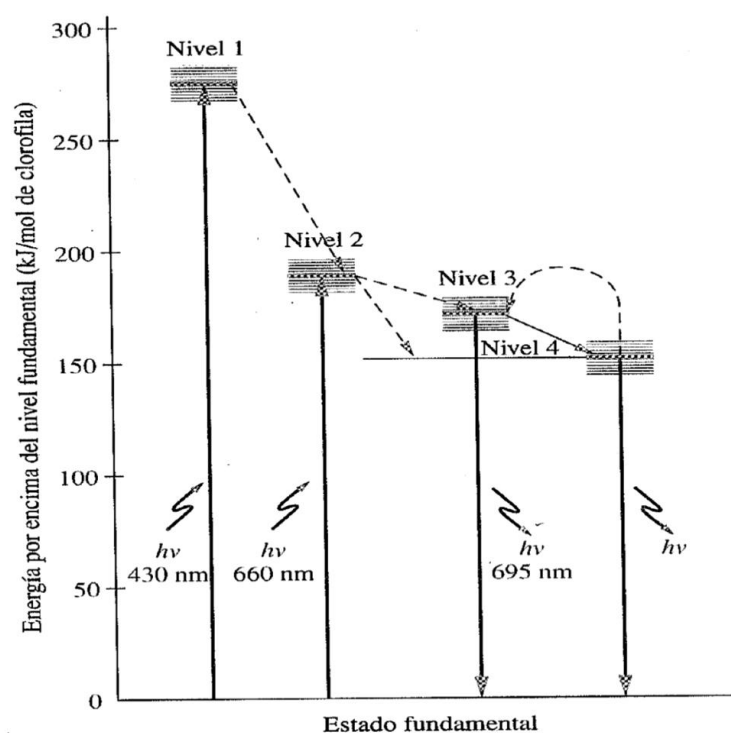


Fig. 5. Estados electrónicos y transiciones electrónicas en una molécula de clorofila a (Barceló-Coll, et al., 2001)

El espectro característico de absorción de la clorofila (Fig. 4) ha hecho que muchos investigadores traten de dilucidar el efecto de la aplicación de luz roja y azul únicamente, ya sea de manera individual o empleando ambas. El trabajo con iluminación monocromática en el estudio de la fotosíntesis no es un tema reciente. Engelmann (1843-1909) en 1884 descompuso la luz blanca por medio de un prisma para iluminar un cultivo de microalgas y estableció que la combinación de luz roja y azul era igual de eficiente

que el espectro completo (Gordon & Polle, 2007). La imparable evolución tecnológica ha permitido disponer de fuentes de iluminación de muy diversas características a lo largo del tiempo. En el estudio de cultivos en laboratorio se han empleado generalmente lámparas de descarga o bien lámparas fluorescentes para simular las condiciones de iluminación natural ([Anexo I](#)). Más recientemente se ha comenzado a trabajar con LEDs (del inglés, *Light Emitting Diodes*) y otros tipos de fuentes como el láser y la fibra óptica (Lee & Pálsson, 1994; Tenessen, et al., 1994; Pulz & Scheibenbogen, 1998; Wang, et al., 2007; Yeh & Chung, 2009; Kunjapur & Eldridge, 2010; Chen, et al., 2011; Fu, et al., 2012).

Tabla 1. Energía asociada a diferentes longitudes de onda comprendidas en el rango de radiación PAR (400 - 700 nm), expresada en kJ y en kcal por mol de fotones (E, Einstein).

Longitud de onda (nm)	Energía	
	$\text{kJ} \cdot \text{E}^{-1}$	$\text{E kcal} \cdot \text{E}^{-1}$
400	299,32	71,49
420	285,07	68,09
440	272,11	64,99
460	260,28	62,17
480	249,44	59,58
500	239,46	57,19
520	230,25	54,99
540	221,72	52,96
560	213,80	51,07
580	206,43	49,30
600	199,55	47,66
620	193,11	46,12
640	187,08	44,68
660	181,41	43,33
680	176,07	42,05
700	171,04	40,85

DURACIÓN

Una vez que se conoce la longitud de onda y la intensidad de aplicación solo queda por definir el tiempo de aplicación. Como se verá más adelante hay multitud de formas de cultivar microalgas pero todas ellas se pueden englobar en dos categorías básicas: cultivo al aire libre o en fotobiorreactor, PBR (del inglés, *Photobioreactor*). El cultivo al aire libre está sometido a las condiciones ambientales y el cultivo en fotobiorreactor presenta la posibilidad de controlar todas las condiciones.

Las microalgas en su medio natural están sometidas a las variaciones de iluminación provocadas por la nubosidad, agitación, sombreo, etc. Por otro lado están sometidas a los cambios día/noche. Hay determinados procesos fisiológicos que están relacionados con los ritmos circadianos, como la división celular, la capacidad fotosintética y la absorción de nutrientes (Abalde, et al., 1995).

A pesar de que los periodos de oscuridad suponen que no se esté produciendo biomasa, se ha constatado que los periodos de oscuridad son necesarios para lograr resultados óptimos (Abalde, et al.,

1995) ya que en caso de iluminación continua disminuye la eficiencia de las enzimas implicadas en la fijación de carbono (Mortain-Bertrand, et al., 1987).

En los últimos tiempos se han desarrollado trabajos que pretenden dilucidar los efectos de la aplicación de luz en forma de pulsos. En este sentido se ha llegado a la conclusión de que ciclos del orden de milisegundos se traducen en aumentos de la eficiencia fotosintética, en comparación con la iluminación sin pulsos, pero que ocurre lo contrario si los ciclos son del orden de segundos (Xue, et al., 2011). Si los periodos de oscuridad son del orden de horas además del descenso en la tasa de eficiencia fotosintética se pueden producir pérdidas de biomasa por respiración (Carvalho, et al., 2011) que pueden alcanzar el 25 % (Kunjapur & Eldridge, 2010). La aplicación de luz en forma de pulsos permite a las microalgas desarrollar una tasa fotosintética igual o superior que la que se puede conseguir cuando la luz se aplica de forma continua, teniendo una eficiencia fotosintética mayor (Qiang, et al., 1998; Carvalho, et al., 2011). En otros casos se han conseguido elevar las tasas de crecimiento de las microalgas optimizando la relación entre los ciclos luz/oscuridad y la agitación del cultivo en fotobiorreactor de paso lumínico corto (Richmond & Qiang, 1997).

1.2.3.2. TEMPERATURA.

La temperatura es un parámetro del cultivo que presenta una estrecha relación con el resto de los parámetros, sobre todo con la luz y los nutrientes. La temperatura óptima del cultivo depende principalmente del microalga que se emplee y de sus características, pero por otra parte el valor óptimo puede variar en función de los valores de los demás parámetros. Así la temperatura óptima en condiciones naturales generalmente no coincide con la temperatura óptima en condiciones de cultivo porque los parámetros de cultivo difieren a su vez de los que se dan en su ambiente natural.

Las variaciones en la temperatura del cultivo presentan una respuesta concreta en el crecimiento de la biomasa. La relación entre la temperatura y el crecimiento se distribuye en tres fases (Fig. 6): una primera fase en la que el aumento de la temperatura implica el aumento de la tasa de crecimiento hasta alcanzar la segunda fase, que se corresponde con el óptimo de temperatura (en esas condiciones), a partir del cual si la temperatura continúa aumentando se entraría en la fase tercera en la que la tasa de crecimiento es negativa. La tasa de crecimiento negativa característica de esta fase se puede deber a que las altas temperaturas interrumpan procesos de regulación metabólica o que directamente se produzca la muerte celular (Abalde, et al., 1995).

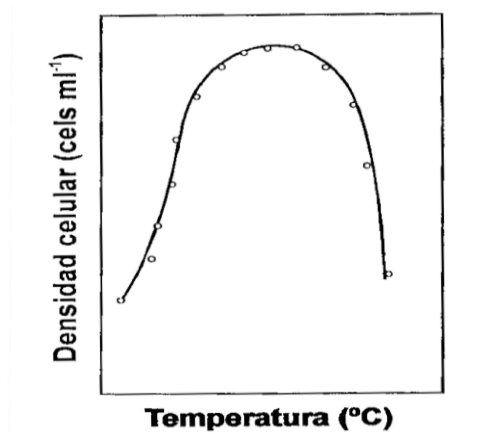


Fig. 6. Crecimiento en función de la temperatura (Abalde, et al., 1995).

Uno de los aspectos de mayor influencia en la temperatura óptima es el grado de iluminación. Con niveles de iluminación bajos la temperatura óptima presenta valores menores que cuando la iluminación es alta. El punto de saturación lumínica se alcanza a valores menores cuando la temperatura es baja, y viceversa. Existe un nivel de iluminación óptimo para cada temperatura de cultivo (Abalde, et al., 1995).

Valores altos de temperatura e iluminación provocan una actividad más intensa, pero esto no repercute solo en una mayor tasa fotosintética sino que induce también una fotorespiración más activa que supone una pérdida considerable de biomasa (Vonshak & Torzillo, 2004).

Por otro lado se ha visto que la temperatura también afecta al grado de disponibilidad de los nutrientes (Abalde, et al., 1995). Para mantener una tasa de crecimiento constante a diferentes temperaturas se necesitaría un aporte mayor de nutrientes cuando la temperatura es menor (Hu, 2004).

Las interacciones de la temperatura con los demás factores de producción complican el establecimiento de un valor de temperatura óptima para el cultivo. Por ello se define un rango, en el que en condiciones no limitantes de los demás factores de producción, la temperatura sería la óptima para el crecimiento. Los valores más frecuentes de temperatura se encuentran entre 18 y 25 °C (Abalde, et al., 1995), pero así mismo también se observan casos en los que la temperatura óptima es superior a 40 °C en determinadas condiciones, (Morita, et al., 2000).

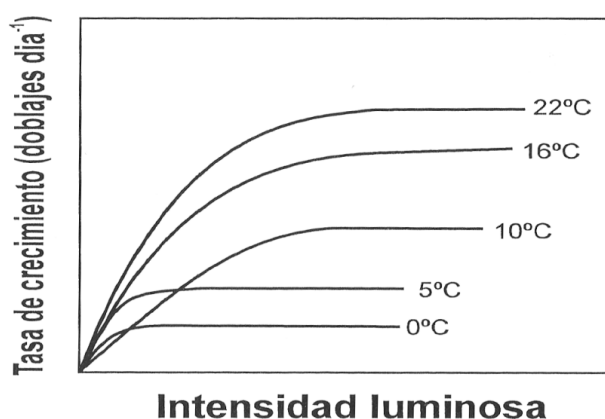


Fig. 7. Evolución de la tasa de crecimiento en función de la intensidad luminosa para distintas temperaturas (Abalde, et al., 1995).

1.2.3.3. PH.

La importancia del pH en el cultivo de microalgas se debe a que en función de su valor variará la disponibilidad de los nutrientes y la solubilidad de los gases (afectada también en función de la temperatura). Al igual que todos los parámetros de cultivo el valor óptimo de pH dependerá de las características de cada microalga. Aún así la mayor parte de los valores óptimos se encuentran en el rango de 7 a 8. Los valores de pH por encima del óptimo son tolerados mejor que los descensos de pH, que suelen ser letales (Abalde, et al., 1995)

El pH a su vez se ve influenciado por todos los parámetros de cultivo ya que el propio medio de cultivo generalmente tiene capacidad tampón, el consumo de los nutrientes afectan a los niveles de pH, la temperatura influye en la solubilidad del CO₂ que a su vez lo hace sobre los valores de pH, etc. De este modo el pH presenta una evolución a lo largo del cultivo muy relacionada con el desarrollo del mismo.

1.2.3.4. MEZCLADO - AIREACIÓN.

Cuando no hay limitaciones de otro tipo el mezclado es el factor determinante de la producción (Suh & Lee, 2003). El mezclado incrementa la producción al incidir principalmente en dos aspectos: incrementa la frecuencia de exposición de las células a la luz y favorece la transferencia de masa entre los nutrientes y las microalgas (Kunjapur & Eldridge, 2010). En general los efectos positivos que tiene el mezclado son (Abalde, et al., 1995):

- I. promover la distribución homogénea de las microalgas y los nutrientes en el medio de cultivo, evitando que se formen gradientes nutricionales;
- II. mejorar la penetración de la luz en el cultivo, ya que evita que las células se sombreen entre ellas y facilita el movimiento de las mismas de las zonas de sombra a las zonas fóticas. Si el mezclado se hace introduciendo aire, las propias burbujas facilitan el paso de la luz a través del medio (Eriksen, 2008);
- III. evitar la sedimentación del cultivo;
- IV. evitar la acumulación de oxígeno disuelto que podría llegar a ser tóxico para las microalgas (Ugwu, et al., 2007);
- V. favorecer la distribución de la temperatura en el cultivo.

Hay varias soluciones para llevar a cabo el mezclado. Se pueden emplear medios mecánicos, como paletas o hélices, o bien se puede hacer mediante aireación empleando bombas de aire. La solución que emplea bombas de aire es quizás la más interesante debido a que se puede llevar a cabo introduciendo CO₂ (como fuente de carbono) en el cultivo además de aire. La introducción de CO₂ como fuente de carbono es interesante porque aumenta sustancialmente la productividad además de mantener el pH en niveles adecuados, 7,5 - 8 (Abalde, et al., 1995).

El mezclado genera un papel importante en los ciclos de luz/oscuridad. Recientemente se ha evaluado la interacción de la iluminación aplicada en pulsos con la turbulencia generada en el mezclado, viéndose que en fotobiorreactores de paso lumínico estrecho, se pueden emplear intensidades lumínicas crecientes si se genera una turbulencia creciente a la vez (Richmond & Qiang, 1997; Qiang, et al., 1998; Grobbelaar, 2009; Grobbelaar, 2010).

1.2.3.5. NUTRIENTES Y MEDIOS DE CULTIVO.

Las microalgas no presentan unos requerimientos nutricionales complejos, pero al igual que cualquier otro tipo de cultivo, sus necesidades serán mayores cuanto más intensivo sea el cultivo. Los nutrientes necesarios se pueden incluir en dos grupos principales: macro y micronutrientes. Esta clasificación se hace en función de la cantidad que se requiera de cada uno de ellos. Los macronutrientes forman parte de las moléculas estructurales y son el carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno y fósforo, así como calcio, magnesio, azufre y potasio. Los micronutrientes son necesarios en pequeñas cantidades pero su importancia es vital para el desarrollo y la actuación de enzimas, así como factores de crecimiento. Principalmente son manganeso, hierro, cobre, molibdeno y cobalto, pero es frecuente la inclusión en la formulación de vitaminas y en algunos casos antibióticos.

Los macronutrientes H y O generalmente no se tienen en cuenta en la preparación del medio de cultivo porque se están presentes en el agua del medio y en el aire empleado en el mezclado. Algo similar ocurre con el C, si se emplea fertilización carbónica no es necesario incluirlo en la formulación del medio.

El carbono presenta una gran importancia debido principalmente a dos factores: es el nutriente más importante porque supone el 50 % de la biomasa (Abalde, et al., 1995) y la forma de aplicación es un factor definitorio del tipo de cultivo. El carbono se puede aplicar en dos formas principales: inorgánico

como CO₂; u orgánico en forma de azúcares o acetato. Si se emplea el carbono en forma inorgánica se está llevando a cabo un cultivo fotoautótrofo, y si la fuente principal de carbono se encuentra en forma orgánica el cultivo será heterótrofico si además el carbono es fuente de energía; o bien será mixotrófico si la energía proviene tanto de la fotosíntesis como del carbono orgánico.

El nitrógeno es el segundo componente mayoritario en la biomasa de las microalgas. Generalmente se aplica en forma inorgánica, pero se puede aplicar en forma orgánica como urea. La forma de asimilación del nitrógeno es como amonio por lo que cuando se aplica el nitrógeno como nitrito o nitrato debe reducirse primero. Pero la aplicación al cultivo de amonio únicamente provoca la acidificación excesiva del medio, por lo que la mejor solución es la conjunción de ureas y formas inorgánicas de nitrógeno (Abalde, et al., 1995).

El resto de nutrientes presentan una importancia menor en cuanto a que su presencia y disponibilidad es incuestionable pero su relevancia en el cultivo es menor. El fósforo por ejemplo es un actor principal en los procesos de transferencia de energía y en el material genético. El azufre y el calcio toman parte en la división celular. El magnesio forma parte de la clorofila y por ellos afecta en la función fotosintética. El hierro, micronutriente, es imprescindible en la fotosíntesis (Abalde, et al., 1995).

Aparte de los nutrientes generales, cada especie o grupo de microalgas puede presentar unos requerimientos específicos.

Se han desarrollado multitud de medios de cultivo a partir de numerosas combinaciones de nutrientes, pero los factores determinantes del éxito de un medio de cultivo, aparte de la característica obvia de que permita y favorezca el crecimiento, son la facilidad de preparación y su bajo coste de producción. El desarrollo de medios excelentes de cultivo pero de precios prohibitivos, no tiene cabida en la producción industrial.

1.2.4. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN.

Hay multitud de maneras de llevar a cabo el cultivo de microalgas pero se pueden dividir principalmente en dos: cultivos al aire libre y cultivos en sistema cerrado.

El cultivo al aire libre se lleva a cabo en su mayoría en estanques artificiales tipo *raceway* (Fig. 9). También se da el cultivo en estanques de otros tipos: circulares, superficiales, profundos, etc. (Oilgae, 2011). Esta forma de cultivo requiere grandes superficies en zonas con alta iluminación, con un coste de instalación muy bajo (Pulz & Scheibenbogen, 1998). El cultivo al aire libre presenta multitud de inconvenientes como pueden ser: las variaciones climáticas, la contaminación, difícil control de la concentración de nutrientes y de la temperatura; y producción menor en comparación con los cultivos cerrados. A parte de la falta total de control en las condiciones de cultivo, el principal problema de esta forma de cultivo es la contaminación con especies indeseadas. Las especies de microalgas que se cultivan principalmente por su contenido en lípidos o en otros compuestos no son generalmente las de más rápido crecimiento, por lo que se pueden ver desplazadas rápidamente por especies contaminantes sin interés comercial (Oilgae, 2011). Por otro lado hay especies de interés comerciales como la *Spirulina* que puede crecer a valores de pH elevados, dónde no hay otra especie que se desarrolle, que tiene especial interés en estos sistemas.

Entre el cultivo al aire libre y el cultivo en sistema cerrado existe una solución intermedia consistente en cubrir el sistema al aire libre. Estos sistemas cuasi-cerrados mitigan los problemas de contaminación y permiten alargar la temporada de producción al actuar como invernaderos. También permiten controlar en mayor o menor medida las condiciones de producción en función de lo complejo que sea el sistema de cobertura (Oilgae, 2011).

El cultivo de microalgas en el mundo supone una producción estimada de 10, 000 toneladas por año. El principal lugar de producción es China que atesora alrededor de la mitad de la producción, seguido por Japón, Taiwán, EE.UU, Australia e India (Benemann, 2008). Prácticamente el 95 % de la producción se lleva a cabo en estanques tipo *raceway* (BioPlat, 2010). La producción en sistemas cerrados tiene un rendimiento mucho mayor pero presenta problemas en la escalabilidad del proceso productivo. Se han reportado máximos de producción (gramos de materia seca) de 2 a 3 g·m⁻²·h⁻¹ en cultivos cerrados (Gordon & Polle, 2007). Estos valores duplican y triplican los valores máximos obtenidos en cultivos al aire libre, pero han sido obtenidos en condiciones de laboratorio o de pequeña planta piloto. Estas situaciones idílicas de partida no se pueden mantener en el cultivo industrial ya sea por motivos económicos o por dificultades técnicas. Buscando soluciones a esta problemática se están desarrollando sistemas de cultivo cerrado con menos dificultades para el proceso de escalado. Se han diseñado multitud de fotobiorreactores pero principalmente se pueden agrupar en tres grupos: de placa plana (*flat plate*), tubulares (horizontales) o de columna (verticales) (Fig. 10 - Fig. 12). La mayor parte de estos fotobiorreactores se instalan al aire libre o en invernadero por lo que la iluminación que reciben es la solar. Por ello al igual que en el caso del cultivo al aire libre la producción está recomendada solo en determinadas zonas geográficas dónde la iluminación es alta y la temperatura permite el cultivo la mayor parte del año. En líneas generales se recomienda el cultivo en zonas situadas entre los paralelos 30 y en los polos (Fig. 8), lugares dónde la radiación es máxima (Oilgae, 2011).

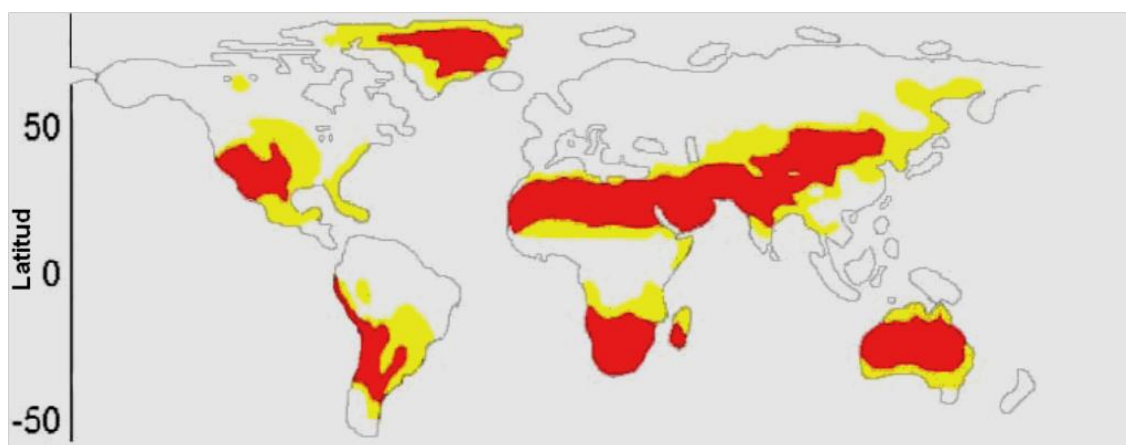


Fig. 8. Mapa de potencialidad para el cultivo de microalgas. Las zonas en rojo son las zonas donde ya se ha comprobado la posibilidad del cultivo y las amarillas son las altamente potenciales (BioPlat, 2010; Oilgae, 2011).

El principal inconveniente de la producción en fotobiorreactores es el elevado coste de instalación en comparación con el de un sistema al aire libre. El éxito de un fotobiorreactor se debe a que sus características permitan obtener la mayor producción posible. Para ello los parámetros de cultivo definidos en los apartados anteriores deben ser atendidos con la mayor eficiencia. La luz es el factor más importante y por ello las características relativas a la iluminación deben ser observadas con sumo cuidado. En este sentido se ha evaluado mucho la eficiencia de la iluminación tanto la eficiencia de conversión de la energía eléctrica en luminosa como la relativa al consumo energético de las lámparas.

La eficacia o rendimiento luminoso se corresponde con el cociente entre el flujo luminoso (medido en lúmenes) emitido por la lámpara y la potencia eléctrica absorbida (medida en W). Teniendo en cuenta que 1 lm se corresponde con una potencia luminosa de 1/683 W emitidos en la longitud de onda de 555 nm, el máximo valor de la eficacia o rendimiento luminoso es de 683 lm/W. Así, una lámpara incandescente tiene una eficacia o rendimiento luminoso de 15 lm/W, una lámpara fluorescente de 80 lm/W, una lámpara de vapor de sodio a baja presión de 150 lm/W y los LEDs de 90-110 lm/W. En muchas ocasiones no se

Menciona la unidad lm/W cuando se hace referencia a los valores que toma esta variable. Es decir, se dice simplemente que el rendimiento luminoso de una lámpara es de 70 (Navas, 2012).

La eficiencia luminosa es un concepto similar al anterior, pero en el numerador del cociente debe figurar el flujo radiante medido en W, el cual considera la potencia emisora total de la fuente de luz. Como las unidades del cociente que expresa la eficiencia luminosa son las mismas (W/W), esta variable se expresa en %. Por ello, el valor máximo que puede adoptar la eficiencia luminosa es del 100%, el cual corresponde a una eficacia o rendimiento luminoso de 683 lm/W. Por ello, los valores aplicables de eficiencia luminosa para los ejemplos de lámparas antes expuestos son los siguientes: lámpara incandescente = 2%, una lámpara fluorescente = 12%, lámpara de vapor de sodio a baja presión = 22% y LEDs = 15% (Navas, 2012).

A pesar de que las lámparas de vapor de sodio presentan la eficiencia mayor no se suelen emplear en condiciones de cultivo porque su espectro de emisión se corresponde con dos franjas muy juntas a 589 nm, zona sin interés para el cultivo (García F. & Boix A., 1999). Las lámparas fluorescentes tienen un espectro continuo y apenas disipan calor por lo que su empleo es frecuente en el laboratorio en contraposición a las lámparas de incandescencia, que además de tener un espectro continuo producen calor debido a su abundante componente de infrarrojo. Los LEDs presentan unas características muy apropiadas para su aplicación en cultivos y el estudio del efecto de diferentes espectros en el desarrollo de los mismos (Yeh & Chung, 2009): emisión en una banda muy estrecha del espectro, disipación de calor mínima, pequeño tamaño, larga duración (de 50,000 a 100,000 horas en comparación con las 1000 de las lámparas incandescentes y las 8000 de las fluorescentes) y resistencia al empleo en iluminación intermitente.



Fig. 9. Cultivo de microalgas en *raceway*. Tomada de Seambiotic Ltd, Israel 18/09/2012 (Kunjapur & Eldridge, 2010).



Fig. 10. Fotobiorreactor de placa plana (*flat plate*). Fuente: Molina-Grima, 2008.

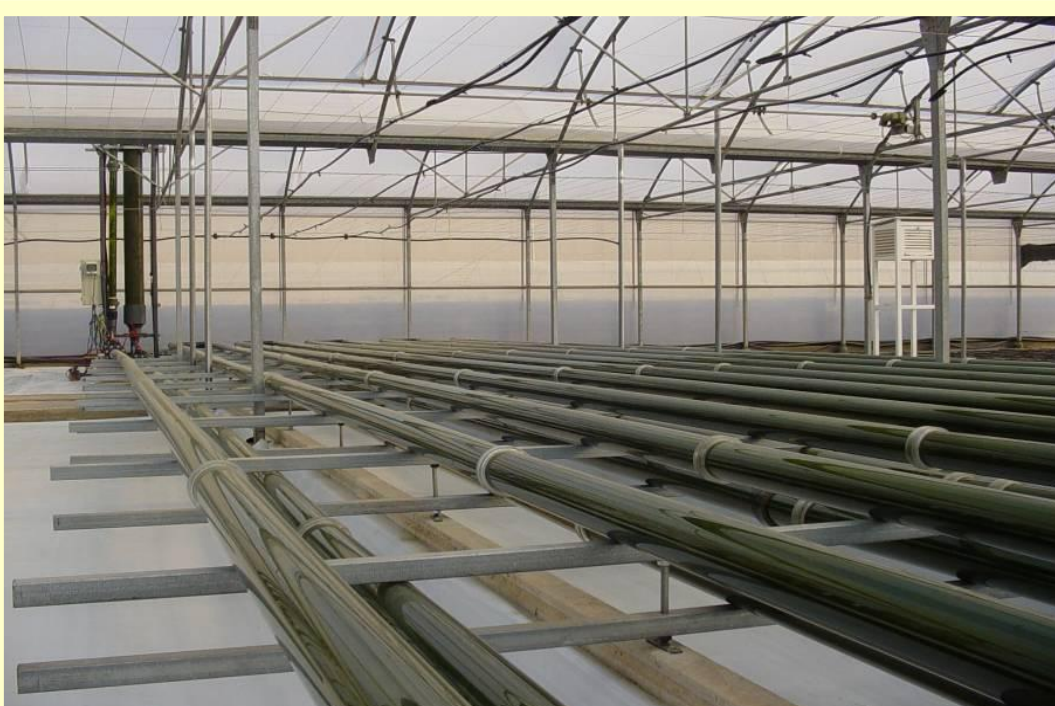


Fig. 11. Fotobiorreactor tubular. (Molina-Grima, 2008).



Fig. 12. Distintos ejemplos de fotobiorreactores en columna (Navas, 2010; Durán, 2011).

Los últimos avances en el diseño de PBRs pasan por la utilización de geotextiles para el crecimiento de las microalgas. Es el caso del diseño llevado a cabo por el Grupo de Agroenergética (GA) de la ETSIA (UPM). Se trata de un biorreactor (Fig. 13) cuya unidad básica consta de un panel hueco en el que las paredes están formadas por mallas y/o láminas de geotextil, por las que descende el medio de cultivo de las microalgas que se recoge en un depósito inferior y es rebombeado continuamente a la parte superior del panel. Por el interior del panel se hacen pasar los gases enriquecidos en CO₂ que quedan confinados en el interior de la cámara por medio del cierre hidráulico que hacen las láminas de geotextil humedecidas (Fernández, 2011).

Las microalgas quedan inmovilizadas en las láminas de geotextil y van generando capas superpuestas de microalgas de tal forma que se pueden recoger directamente por raspado de las capas. El fotobiorreactor ha sido objeto de una solicitud de patente por parte de la UPM presentada en 03.05.2010 y publicada en el BOPI en fecha 20-05-2011 con el número de patente ES 2347 515 B2.

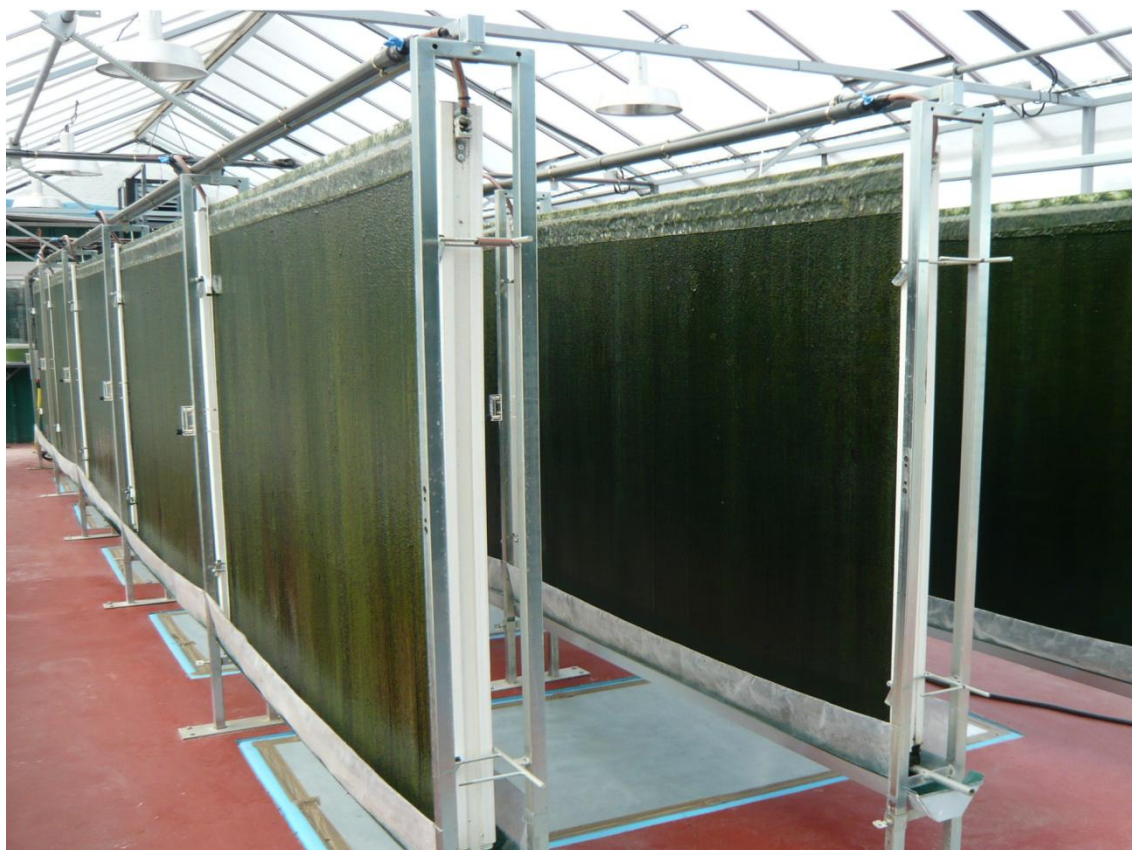


Fig. 13. Conjunto de unidades del sistema PBRL dispuestas en paralelo (Fernández, 2011).

1.3. OBJETIVOS.

En este trabajo se decidió evaluar el efecto de la luz monocromática aportada por LEDs en el cultivo de microalgas. Se quiso comprobar que es posible el cultivo aplicando luz únicamente en las longitudes de onda en las que es teóricamente más efectiva su absorción por ser los picos de actuación de la clorofila; e intentar establecer cuál sería la mejor combinación de luz azul y roja para el cultivo.

Se llevaron a cabo cinco experiencias en las que se varió la cantidad de luz incidente y el color de la misma. En las dos primeras experiencias se empleó luz de un solo color. Para la primera se empleó luz roja y para la segunda luz azul. En las tres siguientes se ensayaron mezclas de ambas, aplicando en la primera 50 % de luz roja y 50 % de luz azul, en la segunda se aplicó 70 % de luz roja y 30 % de luz azul y en la tercera y última 30 % luz roja y 70 % luz azul (Tabla 2).

En las experiencias con luces de un solo color, se empleó la mitad de la intensidad posible con el objetivo de no provocar efectos de fotoinhibición. En ningún caso se empleó la intensidad máxima. Los valores de intensidad más altos se alcanzaron en las experiencias cuatro y cinco, donde se empleó el 70 % de luz roja y azul respectivamente.

Puesto que el objetivo era evaluar el efecto de la luz se decidió no llevar a cabo medidas para favorecer la superproducción que pudieran afectar a los resultados. Por ellos no se añadió CO₂ en forma de gas ni se situó al cultivo en condiciones de temperatura óptimas (el microalga utilizada presenta un óptimo crecimiento a temperaturas superiores a 30 °C, y la temperatura media del cultivo se encontró entre 20 y 25 °C).

Tabla 2. Resumen de las diferentes iluminaciones empleadas en las experiencias. Las dos primeras experiencias se realizaron con focos de LEDs de un solo color (Azul, 454 nm y Rojo, 654 nm). A partir de la tercera experiencia se emplearon iluminaciones mixtas. La intensidad luminosa se reguló mediante *Dimmers*.

Experiencia	Luz Roja (%)	Luz Azul (%)
1	100	-
2	-	100
3	50	50
4	70	30
5	30	70

Para conocer las características de las fuentes de iluminación empleadas y otras no empleadas pero de uso frecuente, se llevó a cabo la evaluación de su espectro de emisión y en algunos casos de la densidad de flujo fotosintético (PFD, del inglés *Photosynthetic Flux Density*) evaluando su PAR. Además se estudió el comportamiento de la luz al atravesar el medio, evaluando los valores de la misma en distintas posiciones dentro del cultivo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL VEGETAL.

Las experiencias se realizaron con la especie *Chlorella sorokiniana* procedente del Grupo de Agroenergética (GA), de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (ETSIA) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM). La cepa fue mantenida en diferentes medios de cultivo con agar. Estos tubos de cultivo en agar inclinado se encontraban a una temperatura de 20 °C y un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 de oscuridad (18/6).

2.1.1. PREPARACIÓN Y MANTENIMIENTO DEL INÓCULO.

La elaboración del inóculo líquido se llevó a cabo a partir de la cepa conservada en tubos de cultivo en agar inclinado. La manipulación en este proceso fue llevada a cabo en condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar. Este inóculo se sembró en conos de cultivo de un litro de capacidad con el mismo medio (Rodríguez-López, 1964) que se utilizó para las experiencias. Los conos (Fig. 18) se mantuvieron a una temperatura de 20 °C y un fotoperiodo 18/6. La luz en este proceso provino de lámparas fluorescentes tubulares (10 - 15 W). En estos conos se introducía continuamente aire del exterior por medio de una bomba. Para regular la intensidad de la aireación y el tamaño de las burbujas se colocó al final de cada tubo una aguja hipodérmica.

Al cabo de una semana de cultivo, la concentración de la microalga había aumentado lo suficiente como para comenzar a extraer inóculos líquidos para los ensayos. Este inóculo primario o *madre* se mantuvo para el resto de ensayos en las mismas condiciones descritas y se fue repartiendo en conos de cultivo periódicamente para evitar la sobresaturación. A estos conos se les añadía medio de cultivo debidamente esterilizado hasta completar el litro de capacidad.

2.2. MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *Chlorella* fue el diseñado por Rodríguez-López (1964), cuya composición se muestra en la Tabla 3.

La preparación del medio de cultivo se realizó para cada nueva experiencia utilizando las soluciones stock en la proporción propuesta en la Tabla 3. Una vez preparado se esterilizó el medio en autoclave a una temperatura de 120 °C durante 20 minutos.

2.2.1. PREPARACIÓN DE LAS EXPERIENCIAS.

Se llevaron a cabo cinco experiencias, para las que se dispuso de un cono testigo y otro con el ensayo correspondiente. El cono testigo fue mantenido en las mismas condiciones de origen (20 °C y fotoperiodo 18/6) mientras que el ensayo fue sometido a las variaciones cuantitativas y cualitativas de luz correspondientes, sin variar el fotoperiodo ni la temperatura.

Para reducir el tiempo de cada experiencia a cinco días se buscó partir de una concentración de microalga alta para evitar así la fase de latencia y estar siempre en fase de crecimiento exponencial (Fig. 14). Para lograr este fin al medio de cultivo, debidamente esterilizado, se le añadía inóculo hasta alcanzar la concentración deseada. La concentración de microalga se midió en función de la densidad óptica con un colorímetro (Fotómetro D-100, Dinko Instruments). En cada experiencia se añadía inóculo al medio hasta alcanzar una densidad óptica próxima a 0,2 unidades de absorbancia.

Tabla 3. Composición del medio utilizado para el cultivo de *Chlorella sorokiniana* propuesto por Rodríguez-López (1964) y proporción relativa de cada solución stock para la elaboración de un litro de dicho medio de cultivo.

Soluciones Stock		Composición	Concentración (g/L)	Volumen (ml) necesario para un litro de medio
Macronutrientes	A	NO ₃ K	10,11	100
		Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	8,11	
		NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,69	
	B	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	24,65	10
	C	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1,47	10
	D	EDTA	9,30	1
		FeSO ₄ ·7 H ₂ O	6,90	
		KOH	0,13	
Soluciones Stock	Composición	Concentración (mg/L)		
Micronutrientes	E	SO ₄ Mn·H ₂ O	170	1
		SO ₄ Zn·7 H ₂ O	290	
		CuSO ₄ ·5 H ₂ O	2,5	
	F	BO ₃ H ₃	61	1
		NH ₄ Mo ₇ O ₂₄ ·4 H ₂ O	12,5	

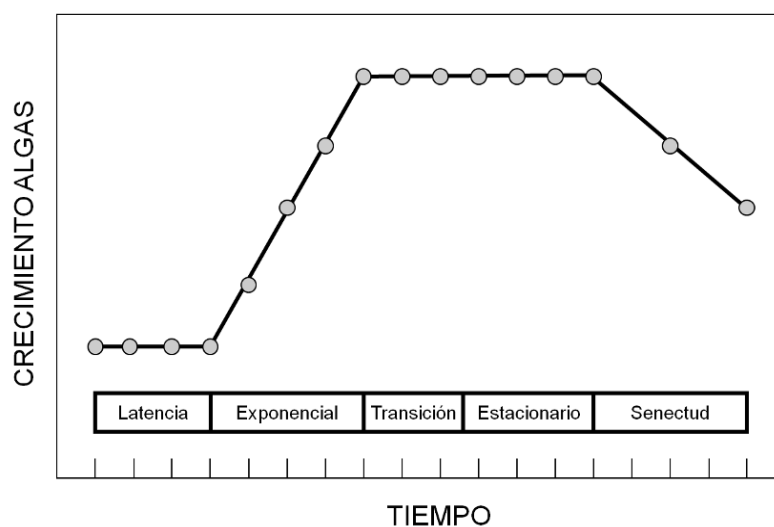


Fig. 14. Esquema de las fases de crecimiento de microalgas en función del tiempo. El crecimiento del cultivo responde a una distribución sigmoidea. Al inicio el crecimiento es nulo o incluso negativo debido a la adaptación a las nuevas condiciones. Una vez superada la fase de latencia el crecimiento es exponencial debido a la abundancia de nutrientes. El crecimiento se estabiliza cuando la población y los recursos se equilibran y alcanza la fase de senectud cuando hay falta de nutrientes.

2.2.2. CALEFACCIÓN Y CONTROL DE TEMPERATURA.

La temperatura del cultivo durante las experiencias se intentó mantener entre 20 y 25 °C. Para ello se dispuso de calefactores sumergibles (ProTemp S100 IPX8; JBL) configurados para proporcionar una temperatura constante de 22 °C (Fig. 15).

A partir de la segunda experiencia se colocaron sensores de temperatura (TMC6-HD; Onset) acoplados a un *Data-logger* (Hobo H08-006-04; Onset) con tres objetivos (Fig. 15):

- Verificar que la temperatura se mantenía en los valores deseados.
- Observar las variaciones provocadas por la inercia del calefactor y el medio.
- Evaluar el efecto del calor desprendido por las diferentes fuentes de luz.

Se configuraron para tomar medidas cada 60 segundos. La configuración de los *Data-logger* y la extracción de los datos se llevó a cabo con el software BOX-CAR 4.3 (BoxCar® Pro 4.3 Software Starter Kit - BCP4.3, Onset) proporcionado por el fabricante.



Fig. 15. En la imagen de la izquierda se puede observar el *Data-logger* (Hobo H08-006-04; Onset) empleado para la adquisición de los valores de la temperatura. La imagen de la derecha se corresponde con el sensor (TMC1-HD; Onset) empleado para la medición de dicha temperatura.



Fig. 16. Imagen de los calefactores empleados (ProTemp S100 IPX8; JBL) en los conos de cultivo. La temperatura seleccionada fueron 22 °C, con el fin de mantener el rango de 20 a 25 °C de temperatura deseado.



Fig. 17. Bomba de aire (Whispa Air Pump AC-1500; RESUN) empleada para la aireación del medio. Se observa el tubo en y griega acoplado a la salida de la bomba para alimentar a los dos conos (ensayo y testigo).

2.2.3. AIREACIÓN DEL MEDIO.

Al igual que en el cultivo y mantenimiento de los inóculos la aireación se llevo a cabo mediante el uso de una bomba de aire (Whispa Air Pump AC-1500; RESUN) y tubos acoplados a una aguja hipodérmica en la parte final (Fig. 18).

Al orificio de salida de la bomba se le acopló un tubo en y griega, con el fin de alimentar tanto al cono del ensayo como al del testigo (Fig. 17).



Fig. 18. Cono de cultivo en el que se puede observar el tubo de aireación con la aguja hipodérmica al final para regular la aireación.

2.3. PLATAFORMA PARA EL ENSAYO

El cono de cultivo dedicado al ensayo fue introducido en una plataforma especialmente diseñada para este efecto. La plataforma, construida en poliuretano, se diseñó con forma de prisma hueco con el objetivo de introducir los LEDs en las caras internas. Con el objetivo de facilitar el manejo, el prisma se dividió en sus caras y éstas se unieron por los vértices mediante bisagras, dejando un vértice libre para poder abrir o cerrar la plataforma (Fig. 19).

En cada cara se dispuso una barra de luz roja y otra de luz azul. Se introdujeron los LEDs en tubos de poliuretano seccionados longitudinalmente, estos tubos se sujetaron a las caras internas de la plataforma mediante dos pinzas del mismo material.

Para el control de la intensidad lumínica se utilizó un cuadro de regulación (Controlador LOGO! OBA6; Siemens) mediante *dimmers* (LGM Dimming Unit; Philips). Cada una de las ocho barras se conectó a un *dimmer* regulado por un mando giratorio, que ofrecía 10 posiciones diferentes, variando entre 0 y 10; siendo 0 la posición de apagado y 10 la de máxima intensidad (Fig. 20 y Fig. 21).



Fig. 19. Plataforma de *Light Emitting Diode* (LED) abierta en la que se pueden observar las barras de LEDs y las diferentes caras unidas por bisagras.



Fig. 20. Cuadro de regulación (Controlador LOGO! OBA6, Siemens) empleado para el control de la intensidad lumínica. Los *dimmer* encargados de controlar la intensidad lumínica se regularon con los mandos giratorios de la parte inferior del cuadro.

Se utilizaron barras de LEDs (GreenPower LED module HF Deep Red y GreenPower LED module HF blue; Philips) alimentadas mediante un convertor de corriente alterna (220 Vca) a corriente continua (12 Vcc) (LED Power Driver IP66 - 100W-24V 100-240V; Philips). El LED rojo presentó un pico de emisión a 656 nm mientras que el LED azul lo hizo a 454 nm (Fig. 22).

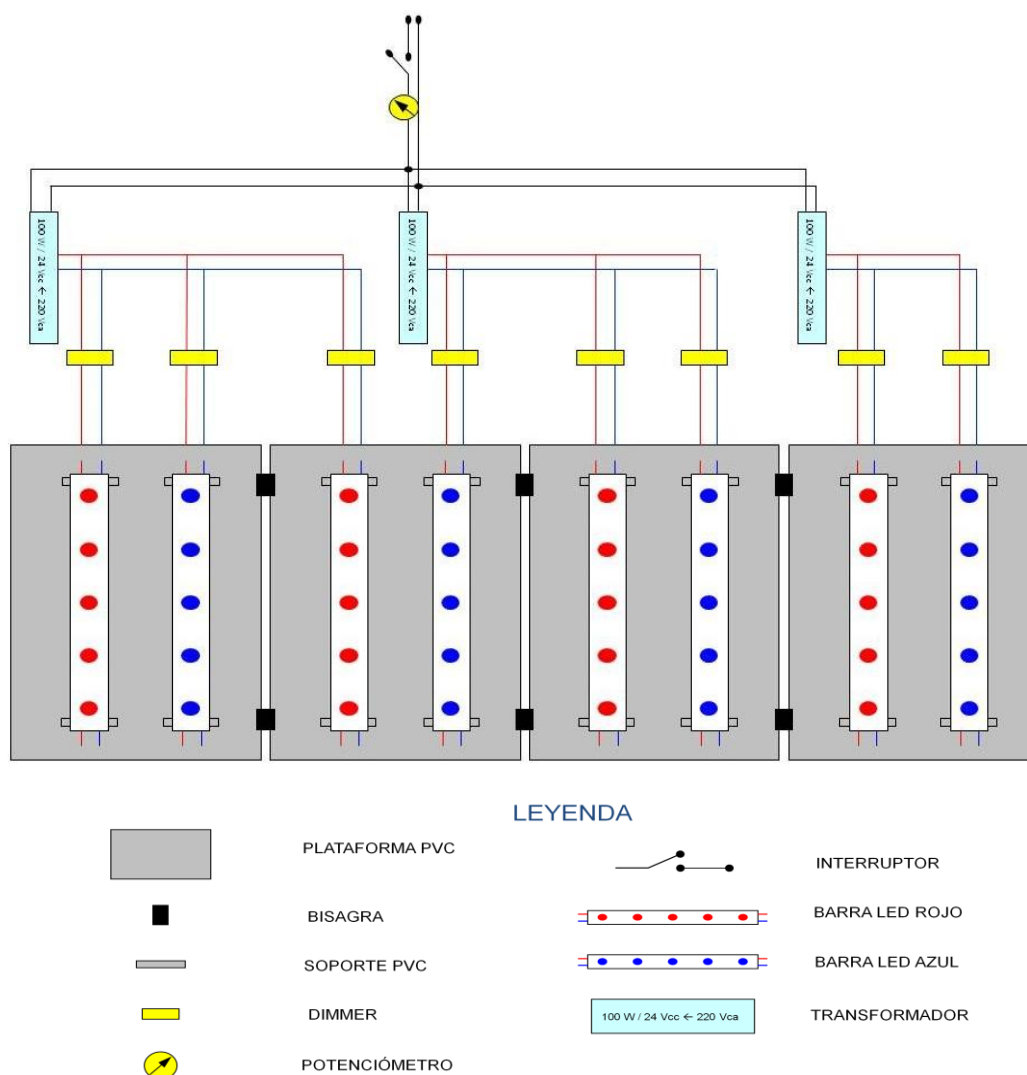


Fig. 21. Representación esquemática del conexionado de la plataforma del ensayo. Cada barra de *Light Emitting Diode* (LED) está conectada a un *dimmer* con el que se regula la intensidad lumínica que proporciona.

2.3.1. EVALUACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE LA LUZ EMPLEADA.

La obtención del espectro de emisión (Fig. 22) de los LEDs se llevó a cabo con un espectroradiómetro (LI-1800, LI-COR). Además se midieron los valores de *Photosynthetically Active Radiation* (PAR) en diferentes situaciones y con diferentes fuentes de luz, empleando sensor de PAR (LI-190, LI-COR) acoplado a un *Data-logger* (LI-1000, LI-COR).

Para obtener una medida más realista de la calidad y la cantidad de luz que estaba llegando a las microalgas en el cultivo, se dispuso de un sensor de PAR esférico y sumergible (LI-193 SA, LI-COR) acoplado a un lector (LI-250 A Light Meter, LI-COR) con el que se pudieron hacer medidas con diferentes concentraciones y con diferentes recorridos lumínicos.

Por otro lado se hizo el espectro de absorción de la microalga utilizada (Fig. 23 y Fig. 24) para evaluar la correspondencia entre los picos de absorción de la microalga y los de emisión de las fuentes de luz. Para ello se empleó un espectrofotómetro (ThermoSpectronic, Aquamate).

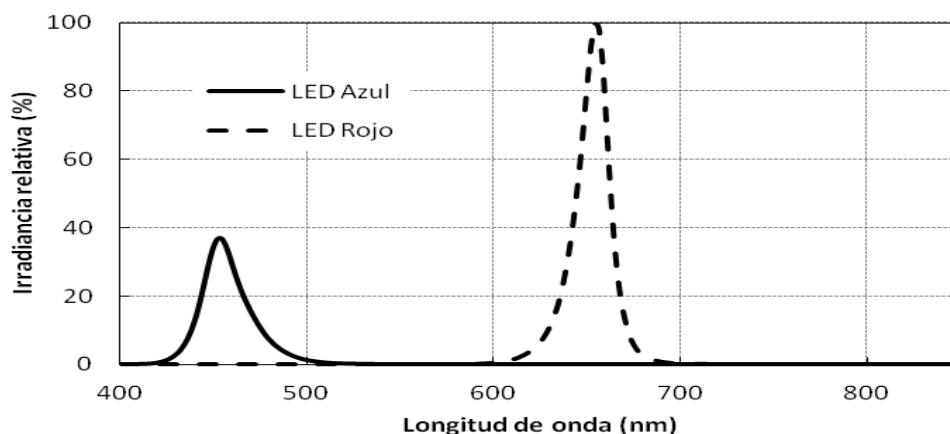


Fig. 22. Espectro de emisión de los *Light Emitting Diode* (LEDs) usados en el ensayo. Se representan los espectros de emisión relativos al LED rojo en función de la longitud de onda. El LED rojo tiene un máximo de emisión a 658 nm y el azul a 454 nm.

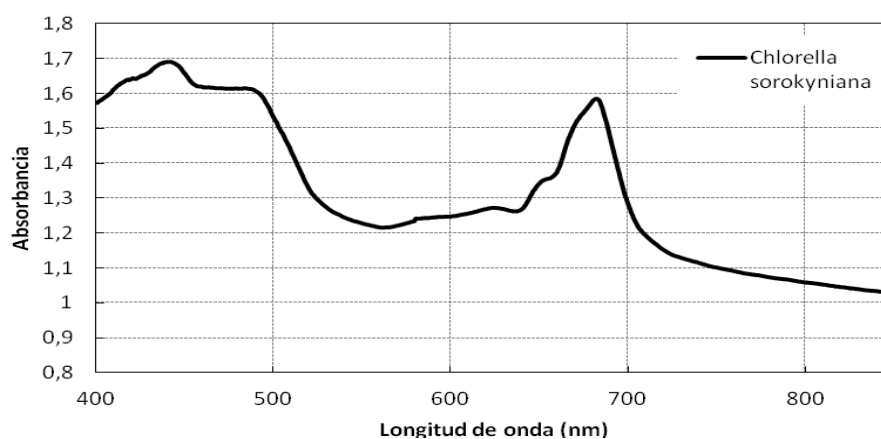


Fig. 23. Espectro de absorción de la microalga *Chlorella sorokiniana* empleada en los experiencias. Se muestra la absorbancia (adimensional) en función de la longitud de onda.

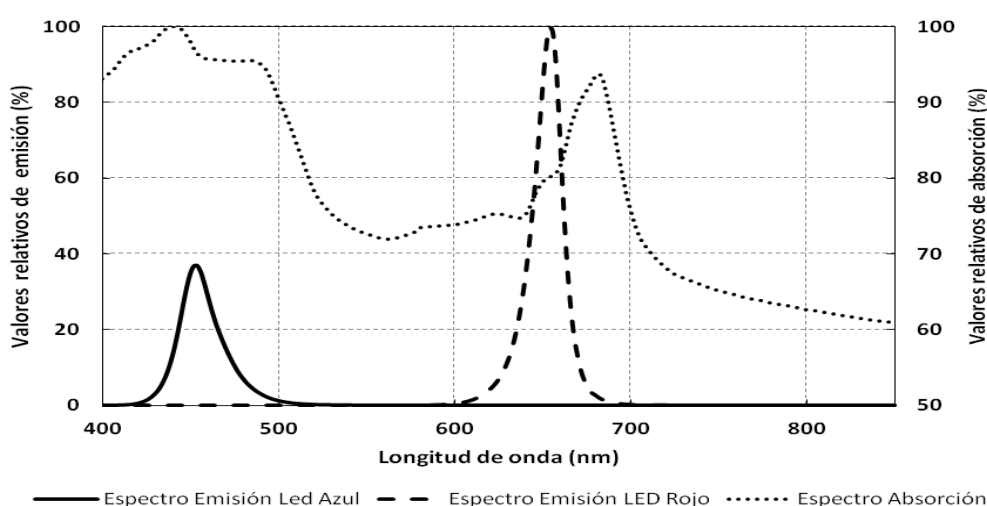


Fig. 24. Comparación entre los espectros de emisión de los *Light Emitting Diodes* (LEDs) Rojo y Azul, con el espectro de absorción de la *Chlorella sorokiniana* empleada en los experiencias. Los valores relativos están expresados en función de la longitud de onda. Se puede observar cómo los picos de emisión de las fuentes de luz coinciden con los de absorción del microalga.

2.4. EVOLUCIÓN DE VARIABLES DIARIAS.

Se hicieron medidas a diario de densidad óptica (DO), pH, conductividad eléctrica (CE), temperatura y contenido de nutrientes. El día del inicio del cultivo se marcaba en el exterior del cono el nivel que alcanzaba el medio después de haber introducido los calefactores, los sensores de temperatura y el dispositivo de aireación. En las observaciones diarias si el nivel del cultivo estaba por debajo de la marca realizada el primer día se añadía agua destilada con el fin de reducir los errores inducidos por la evaporación del medio. Si se había añadido agua destilada se esperaba 20 minutos a que el medio se homogeneizara para realizar las mediciones.

2.4.1. MEDIDA DE DENSIDAD ÓPTICA (DO).

La medida de la densidad óptica se llevó a cabo con un colorímetro (Fotómetro D-100, Dinko Instruments) en el que se utilizó un filtro de 580 nm (Fig. 25). Se emplearon cubetas de 16 mm de diámetro.



Fig. 25. Colorímetro (Fotómetro D-100, Dinko Instruments) empleado para las medidas de la densidad óptica (DO). Se observa a la izquierda de la imagen una gradilla con las cubetas de 16 mm de diámetro empleadas para las mediciones. Para la realización de las medidas se empleó un filtro de 580 nm.

Se utilizó como blanco una cubeta con agua destilada. Las muestras del cultivo se homogeneizaron girando la cubeta suavemente 180 °. El valor de la densidad óptica para cada muestra se obtuvo como media de tres medidas.

Generalmente las medidas realizadas con colorímetros comienzan a desvirtuarse a partir de un determinado valor, a partir del cual las muestras se diluyen para que el valor se incluya en el rango de mayor fiabilidad. Para averiguar cuál era este rango se llevó a cabo la elaboración de una recta de calibración en la que se enfrentaron "Densidad óptica" y "Concentración (mg/L)" ([Anexo II](#)) Los resultados obtenidos muestran que para valores de 0 a 1,5 unidades de absorbancia, la correspondencia es lineal con un valor de R^2 de 0,9944 (Fig. 26).

2.4.2. MEDIDA DE pH, CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (CE) Y TEMPERATURA.

Para la medición del pH y la conductividad eléctrica se empleó un Multímetro (MM 40, Crison) capaz de medir pH, conductividad eléctrica, temperatura y sólidos totales disueltos (Fig. 27). El sensor se mantenía en una solución tampón (KCl 0,1 M) y se lavaba con agua destilada después de cada uso. Para la calibración se emplearon soluciones patrón.

La primera semana se empleó este sensor para hacer las medidas de temperatura porque aún no se disponía de los sensores de temperatura acoplados a un *Data-logger* que se emplearon en las semanas sucesivas (Fig. 15).

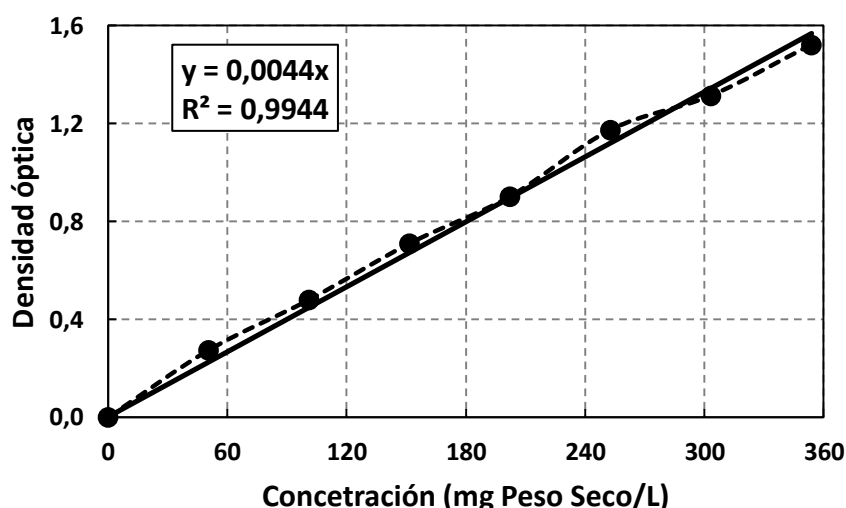


Fig. 26. La recta de calibración muestra que la correspondencia entre la densidad óptica y la concentración (miligramos de peso seco por litro) es lineal con un alto valor de R^2 para valores de densidad óptica entre 0 y 1,5 unidades de absorbancia.



Fig. 27. Multímetro (MM 40, Crison) empleado para la medición de pH y CE. En la imagen se puede observar que el sensor está protegido por un capuchón, el cual contiene la solución tampón. En la primera semana de experiencias se empleó este sensor para medir la temperatura debido a que aún no se disponía de los sensores de temperatura acoplados a un *Data-logger* que se usaron en las siguientes semanas.

2.4.3. MEDIDA DEL CONTENIDO DE NUTRIENTES.

Se midió diariamente el contenido en Ca^{+2} , Cl^- , K^+ , Na^+ , NH_4^+ y NO_3^- . Para ello se empleó un sensor multi-ión (Multi-Ion Kit, CleanGrow) compuesto por una única sonda en la que se incluyen los seis sensores y un electrodo de referencia (Fig. 28).

La evaluación de los resultados obtenidos con este aparato no ha sido concluyente debido principalmente a que el rango de pH apto para la medida era rápidamente superado por el cultivo. Este aparato está diseñado principalmente para el análisis de aguas o soluciones hidropónicas y probablemente la alta concentración del cultivo haya provocado interferencias en las medidas.



Fig. 28. Sensor Multi-ión (Multi-Ion Kit, Clean Grow) compuesto por una sola sonda en la que se incluyen sensores de Ca^{+2} , Cl^- , K^+ , Na^+ , NH_4^+ y NO_3^- .

3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. PRIMERA EXPERIENCIA, LUZ ROJA AL CINCUENTA POR CIENTO DE INTENSIDAD.

Se partió de una densidad óptica de 0,22 unidades de absorbancia. La temperatura del cultivo al inicio del ciclo fue de 22 °C, el pH de partida fue 7,5 y la conductividad eléctrica 2,78 mS·cm⁻¹. La configuración del LED empleado produce una densidad de flujo fotosintético (PFD, del inglés *Photosynthetic Flux Density*) equivalente a 315,3 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ en la cara externa del cono.

La evolución de la densidad óptica (Fig. 29) no muestra diferencias notables entre el ensayo (LED) y el testigo (Fluorescente).

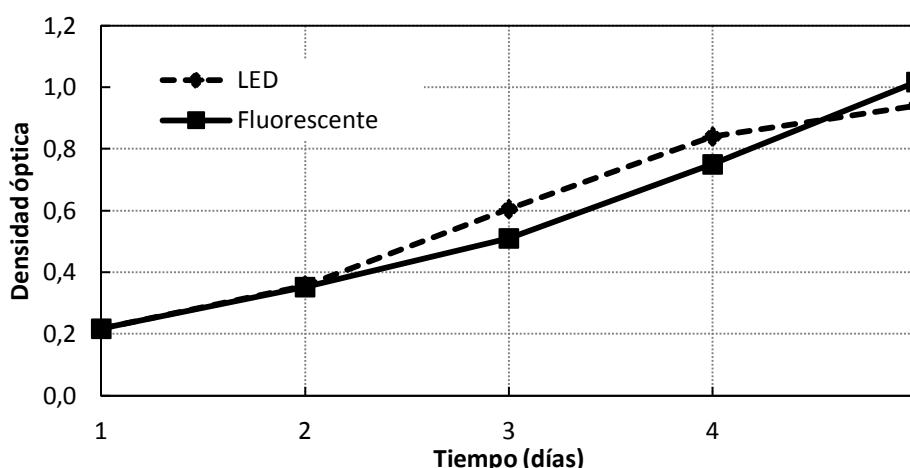


Fig. 29. Evolución diaria de la densidad óptica en la primera experiencia. Se partió de una densidad óptica de 0,22 y se alcanzaron valores ligeramente superiores a la unidad (1,02 unidades de absorbancia). Prácticamente no se observan diferencias entre el ensayo y el testigo. La denominación LED (*Light Emitting Diode*) se refiere al ensayo y Fluorescente se refiere al testigo.

El pH en todas las experiencias llevadas a cabo se elevó muy rápidamente. Fueron frecuentes valores de pH entre 10 y 12. En este caso (Fig. 30) los valores de pH del testigo se mantuvieron siempre por encima de los valores del ensayo, llegando a presentar diferencias superiores a una unidad en el último día del ciclo.

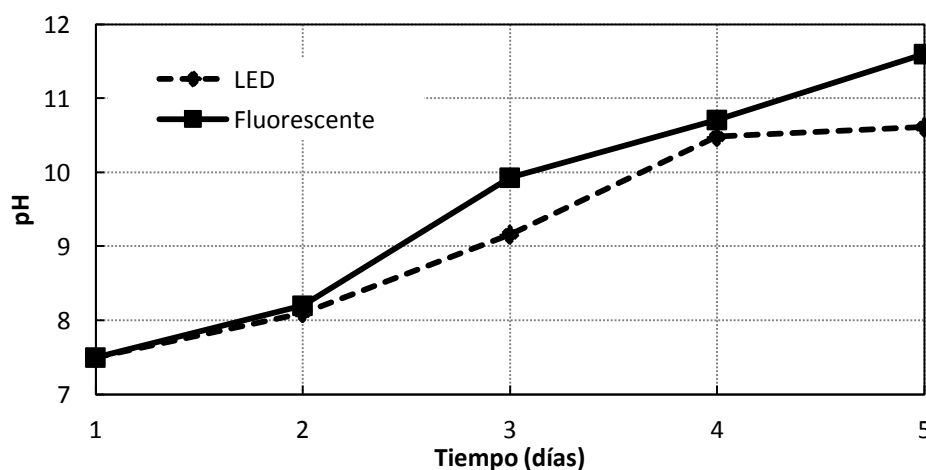


Fig. 30. Evolución diaria de los valores de pH a lo largo de la primera experiencia. El pH del testigo siempre presenta valores superiores al del ensayo llegando a alcanzar diferencias superiores a la unidad en el último día.

La conductividad eléctrica mostró pequeñas variaciones diarias. Los valores de la CE del testigo estuvieron por encima de los del ensayo alcanzando sus mayores diferencias hacia el final del cultivo (Fig. 31).

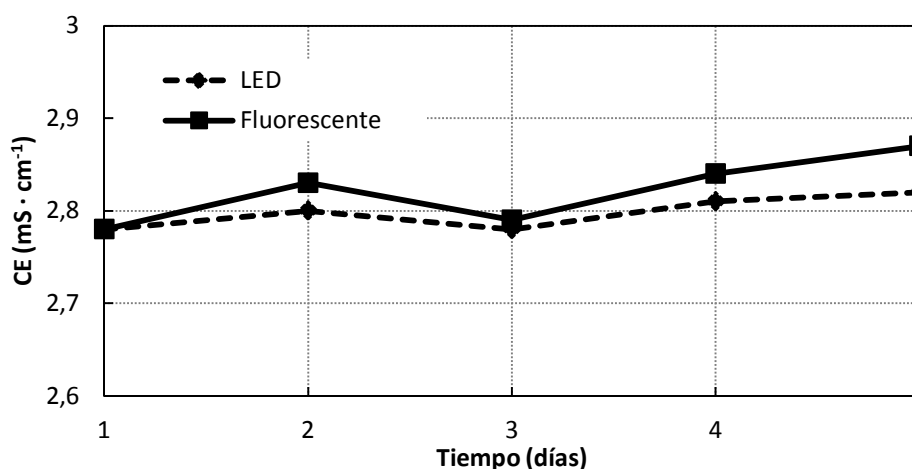


Fig. 31. Evolución diaria de la conductividad eléctrica (CE) en la primera experiencia. Presentan pequeñas diferencias siendo mayores en los últimos días del ciclo.

Para la primera experiencia no se dispuso de los sensores de temperatura acoplados a un *Data-logger* que se emplearon en los consecutivos por lo que no se pudo contemplar la evolución de la temperatura. En esta experiencia se tomó una medida diaria de la temperatura con el multisensor empleado para la medida de pH y CE. Debido a esto los datos obtenidos (Fig. 32) no son representativos ni la evaluación de los mismos es concluyente.

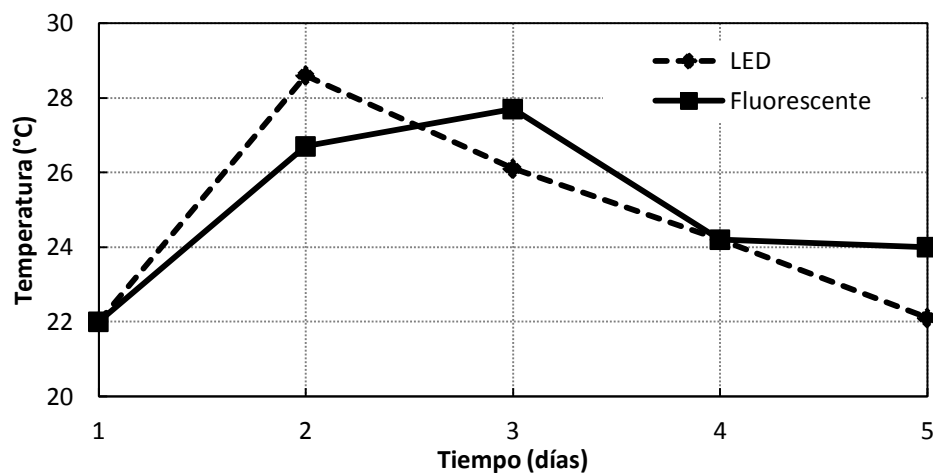


Fig. 32. Evolución diaria de la temperatura en la primera experiencia. Para esta experiencia no se disponía aún de los sensores de temperatura acoplados a un *Data-logger* que se emplearon en las sucesivas. Debido a esto los datos que se muestran no se pueden tomar como relevantes.

3.2. SEGUNDA EXPERIENCIA, LUZ AZUL CINCUENTA POR CIENTO DE INTENSIDAD.

En esta experiencia la densidad óptica inicial fue 0,21 unidades de absorbancia. El pH y la conductividad eléctrica de partida fueron de 7,83 y 2,67 mS·cm⁻¹, respectivamente. La temperatura de inicio fueron 22 °C al igual que en el resto de las experiencias. La configuración del LED empleada supone una PFD de 212,9 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, medida en la cara externa del cono.

La evolución de la densidad óptica no mostró diferencias significativas entre ensayo y testigo, siendo el crecimiento del testigo ligeramente superior al del ensayo (Fig. 33). El aumento de la concentración de microalga fue menor que en la primera experiencia en la que se alcanzaron valores ligeramente superiores a la unidad.

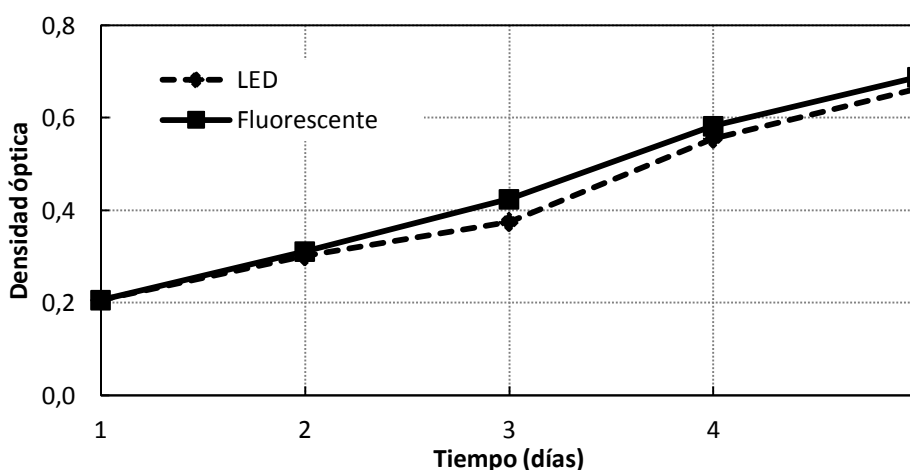


Fig. 33. Evolución diaria de la densidad óptica en la segunda experiencia. Se puede ver cómo las curvas de crecimiento son prácticamente iguales. El aumento de la concentración de microalga es pequeño a lo largo del experiencia teniendo un crecimiento ligeramente mayor el testigo sobre el ensayo.

El pH de nuevo alcanzó valores muy altos (hasta 11,5) y presentó un gran aumento entre el segundo y el tercer día. El pH del ensayo fue ligeramente superior al del testigo pero sin mostrar grandes diferencias (Fig. 34).

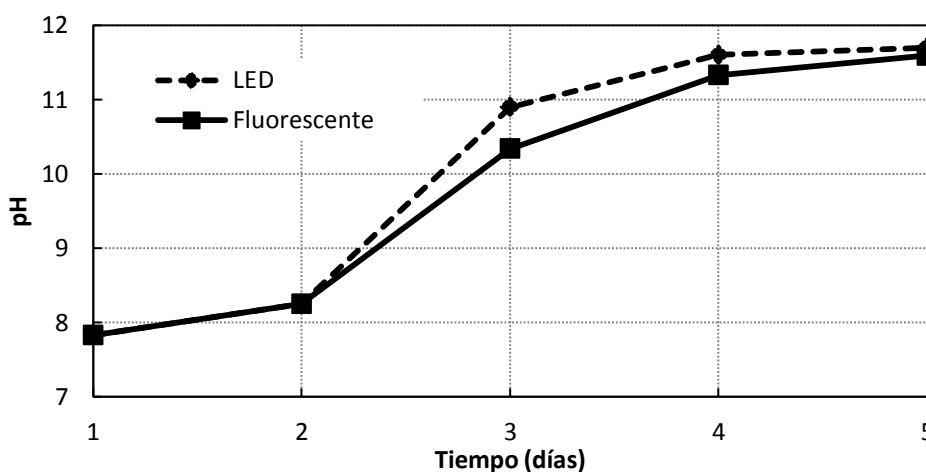


Fig. 34. Evolución diaria del pH en el segundo experiencia. Se observa que las curvas son muy similares, siendo ligeramente superior la curva que se corresponde con el ensayo. Entre el segundo y el tercer día se produce un gran aumento en el pH.

La conductividad eléctrica en esta experiencia presenta una tendencia descendente. En la curva correspondiente al testigo se observa un descenso brusco entre el primer y el segundo día, mientras que en el caso del ensayo el descenso de los valores es menor. A partir del tercer día ambos valores parecen estabilizarse permaneciendo la curva del testigo en valores superiores al ensayo. Sin embargo, al final del ciclo los valores son prácticamente iguales (Fig. 35).

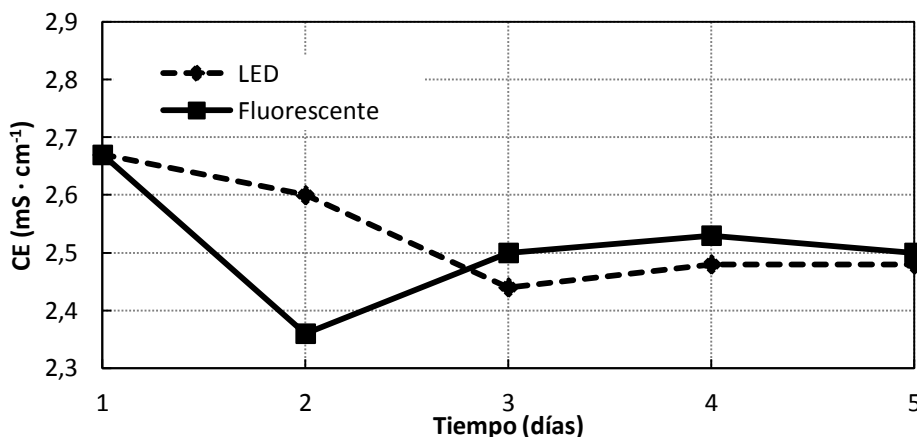


Fig. 35. Evolución diaria de la conductividad eléctrica (CE) en la segunda experiencia. Los valores tienden a estabilizarse a partir del tercer día, a pesar de que entre el primer y el segundo día sufren un descenso acusado, siendo mayor en el caso del testigo.

A partir de esta segunda experiencia se comenzó a disponer de los sensores de temperatura acoplados a un *Data-logger*. Se programaron para la toma de datos cada 60 segundos de manera que se pueden observar las oscilaciones térmicas producidas a lo largo de la experiencia por el cambio día-noche y la inercia del calefactor (Fig. 45). Los calefactores se programaron a 22 °C para que la temperatura se mantuviese entre 20 y 25 °C, pero se observa que en ambos la temperatura sobrepasa los 25 °C con frecuencia. En el caso del ensayo la temperatura baja de 20 °C llegando a situarse en algo más de 17 °C. La temperatura media del testigo (24,60 °C) es muy superior a la del ensayo (20,68 °C).

3.3. TERCERA EXPERIENCIA, LUZ ROJA CINCUENTA POR CIENTO Y LUZ AZUL CINCUENTA POR CIENTO DE INTENSIDAD.

La densidad óptica de partida en esta experiencia fue de 0,19 unidades de absorbancia y el pH y la conductividad eléctrica mostraron valores iniciales de 7,98 y 2,44 mS·cm⁻¹, respectivamente. La temperatura se estableció de nuevo en 22 °C. A esta configuración de los LEDs le corresponde una PFD de 511,6 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, medida en la cara externa del cono.

La evolución de la densidad óptica en la experiencia presentó diferencias relevantes entre el ensayo y el testigo, siendo el crecimiento del ensayo superior al del testigo. A partir del segundo día la curva de densidad óptica del ensayo comienza a separarse de la del testigo y a incrementar su pendiente. En cambio el testigo mantiene una tendencia de crecimiento similar en los cuatro primeros días y comienza a aumentar su pendiente a partir del cuarto día (Fig. 36).

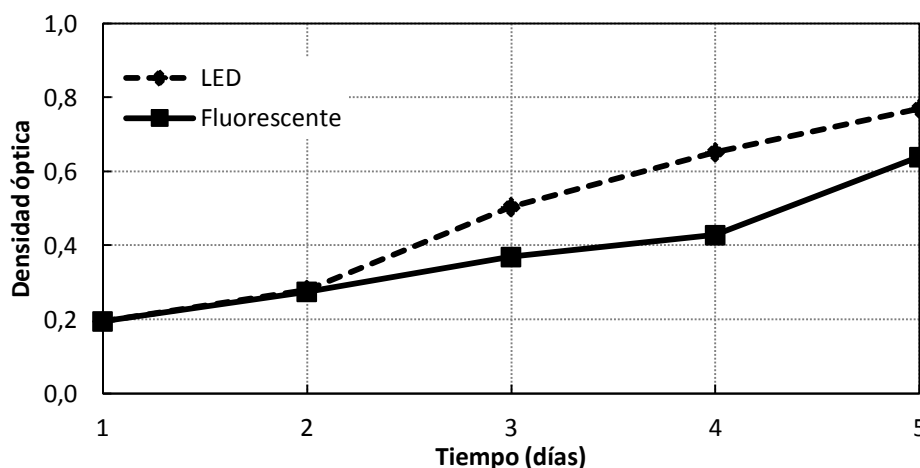


Fig. 36. Evolución diaria de la densidad óptica en la tercera experiencia. Se observan claras diferencias entre el crecimiento del ensayo y del testigo, siendo superior el crecimiento del ensayo. A partir del segundo día la pendiente de la curva de crecimiento en el ensayo comienza a aumentar y se separa claramente de la del testigo. En el testigo parece que la pendiente de crecimiento aumenta a partir del cuarto día.

El pH del testigo se mantuvo por debajo de los valores que alcanzó el pH del ensayo. Al final del ciclo de cultivo prácticamente se igualaron (Fig. 37). De nuevo se alcanzaron valores muy elevados.

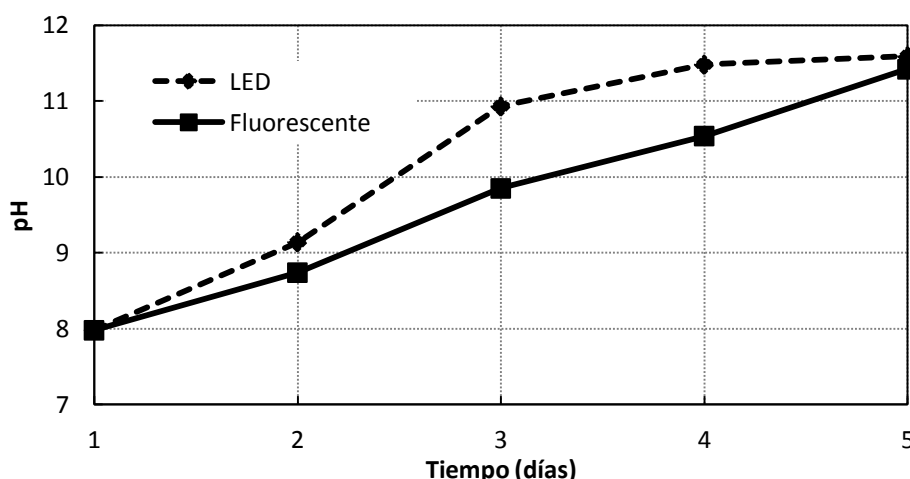


Fig. 37. Evolución diaria del pH en la tercera experiencia. El pH del ensayo fue superior al del testigo aunque al final del ciclo de cultivo prácticamente se igualaron.

La conductividad eléctrica sufrió un descenso acusado entre el primer y el segundo día para luego mostrar una tendencia creciente tanto en el caso del ensayo como del testigo. Las curvas no presentan diferencias notables entre ambos (Fig. 38).

La temperatura se mostró de nuevo superior en el testigo que en el ensayo. La diferencia que se venía observando de unos 4°C entre testigo y ensayo se repitió en esta experiencia. El ensayo mostró oscilaciones térmicas entre 17 y 26 °C mientras que en el testigo la temperatura varió entre 21 y 27 °C. De esta manera se obtuvieron temperaturas medias de 20,54 y 24,15 °C en ensayo y testigo respectivamente (Fig. 46).

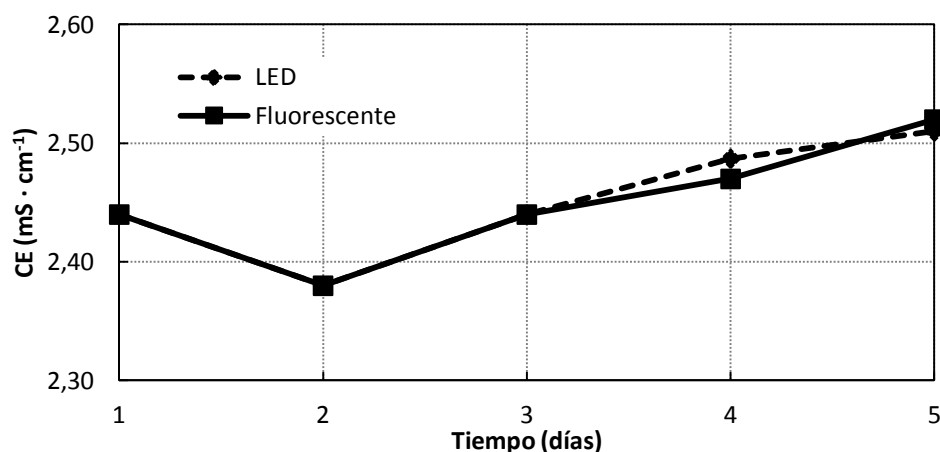


Fig. 38. Evolución diaria de la conductividad eléctrica en la tercera experiencia. Sufre un descenso acusado entre el primer y el segundo día, pero luego muestra una tendencia creciente. No hay prácticamente diferencias entre las curvas de testigo y ensayo.

3.4. CUARTA EXPERIENCIA, LUZ ROJA SETENTA POR CIENTO Y LUZ AZUL TREINTA POR CIENTO DE INTENSIDAD.

La experiencia partió de una densidad óptica de 0,19 unidades de absorbancia, pH de 7,90 y CE igual a 2,50 mS·cm⁻¹. La temperatura se fijó de nuevo en 22 °C. La PFD para esta configuración de los LEDs es igual a 600,8 μmol · m⁻² · s⁻¹. La evolución de la densidad óptica fue muy similar en ambos casos, siendo las curvas de crecimiento prácticamente idénticas (Fig. 39).

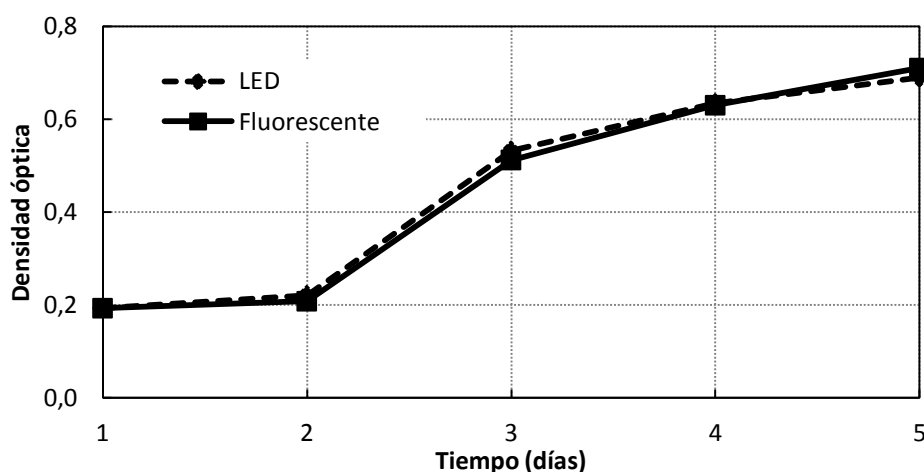


Fig. 39. Evolución de la densidad óptica en el cuarto experiencia. Las curvas de crecimiento no muestran apenas diferencias.

El pH de nuevo alcanzó valores altos, siendo superior el pH del ensayo al del testigo aunque al final del ciclo los valores prácticamente se igualaron (Fig. 40).

La conductividad eléctrica presentó un descenso acusado en el segundo día, siendo mucho mayor en el caso del ensayo que del testigo. Después de este descenso la CE observó una nueva fase de crecimiento que se acaba estabilizando al final del ciclo, dónde no hay diferencias en los valores de ensayo y testigo (Fig. 41).

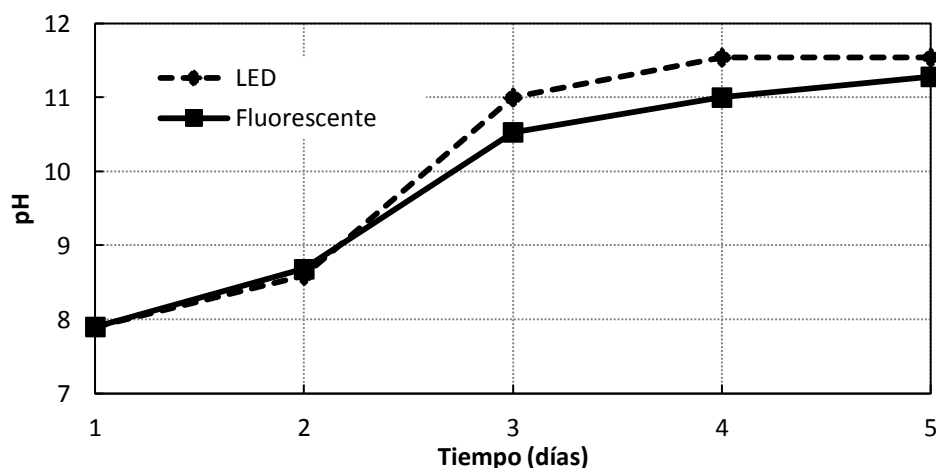


Fig. 40. Evolución diaria del pH en la cuarta experiencia. De nuevo se alcanzan valores elevados y son superiores en el caso del ensayo que del testigo. Al final del ciclo el valor de pH es muy similar en ambos.

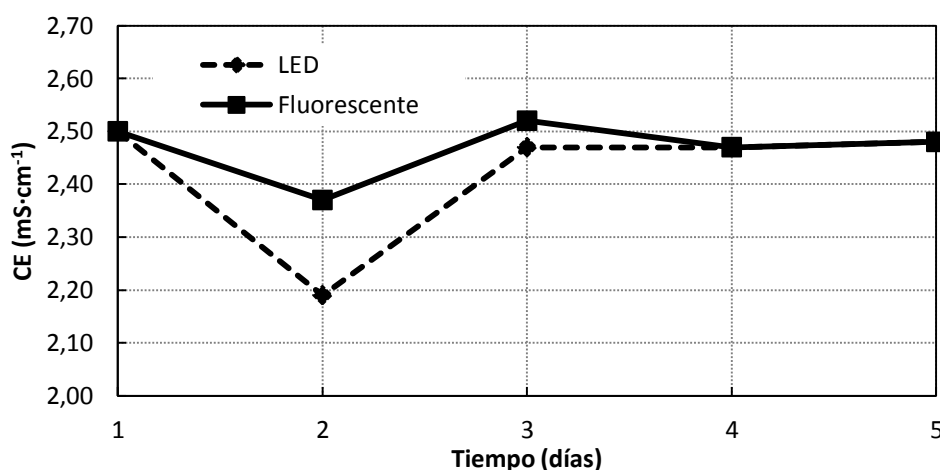


Fig. 41. Evolución diaria de la CE en la cuarta experiencia. Se observa que en el segundo día hay un descenso de los valores, siendo más acusado en el caso del ensayo que del testigo, para luego remontar y situarse en valores similares al final del ciclo.

La evolución de la temperatura en esta experiencia muestra de nuevo que se presentan diferencias térmicas de 4°C entre ensayo y testigo, siendo superior la temperatura del testigo (Fig. 47). En el ensayo se obtuvo una temperatura media de 19, 84 °C mientras que en el testigo la temperatura alcanzada fue de 24, 77 °C. Se observa que la temperatura en esta experiencia sobrepasa los valores establecidos como rango térmico (20 - 25 °C) tanto superior como inferiormente. Cabe destacar que en el ensayo entre el tercer y el cuarto día las temperaturas estuvieron siempre por debajo de 22 °C llegando incluso a los 14 °C. En el testigo se observa también que entre el cuarto y el quinto día la temperatura osciló entre 17 y 23 °C durante gran parte del día. En ambos casos estas temperaturas inusuales se debieron a problemas puntuales en la aireación. Las agujas encargadas de la regulación del tamaño de la burbuja del aire empleado para la agitación y aireación del cultivo presentaron problemas parciales de tупido entre el tercer y el cuarto día en el caso del ensayo y entre el cuarto y el quinto día en el caso del testigo. Estos problemas solo se observaron *a posteriori* durante la evaluación de los datos de temperatura. Se dedujo que podría deberse a problemas en la aireación ya que los demás componentes del equipo no mostraron problemas. Pese a todo, estos bajos valores de temperatura no parecen haber tenido influencia en el

desarrollo del microalga ya que no se observa nada extraño en el crecimiento. Esto puede ser debido a que estas temperaturas se dieron durante la fase oscura del fotoperiodo, es decir, entre las 22:00 y las 04:00. Después de esto, las agujas fueron reemplazadas por otras nuevas para el siguiente ensayo.

3.5. QUINTA EXPERIENCIA, LUZ ROJA TREINTA POR CIENTO Y LUZ AZUL SETENTA POR CIENTO DE INTENSIDAD.

Las condiciones de partida para esta experiencia fueron las siguientes: densidad óptica 2,3 unidades de absorbancia, pH 7,96 y conductividad eléctrica 2,82 mS·cm⁻¹. La temperatura se fijó en 22 °C de nuevo. Con esta configuración de los LEDs se obtuvo una PFD de 483,4 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

En esta experiencia por primera vez se observó reducción de la densidad óptica. Entre el primer y el segundo día la densidad óptica descendió, siendo el descenso ligeramente superior en el caso del ensayo que del testigo. Este hecho pudo deberse a que el cultivo madre del que se extraían los inóculos estuviese alcanzando la fase de senectud y los inóculos empleados no tuviesen el vigor suficiente. Por otro lado el hecho de que en el ensayo el descenso fuese mayor puede ser debido además a problemas de fotoinhibición. La concentración de microalga al final del ciclo fue baja, posiblemente en relación también con la fase de senectud en el inóculo madre. La curva del ensayo se muestra siempre por debajo de la del testigo, aunque registra valores muy similares y al final del ciclo prácticamente se igualan (Fig. 42).

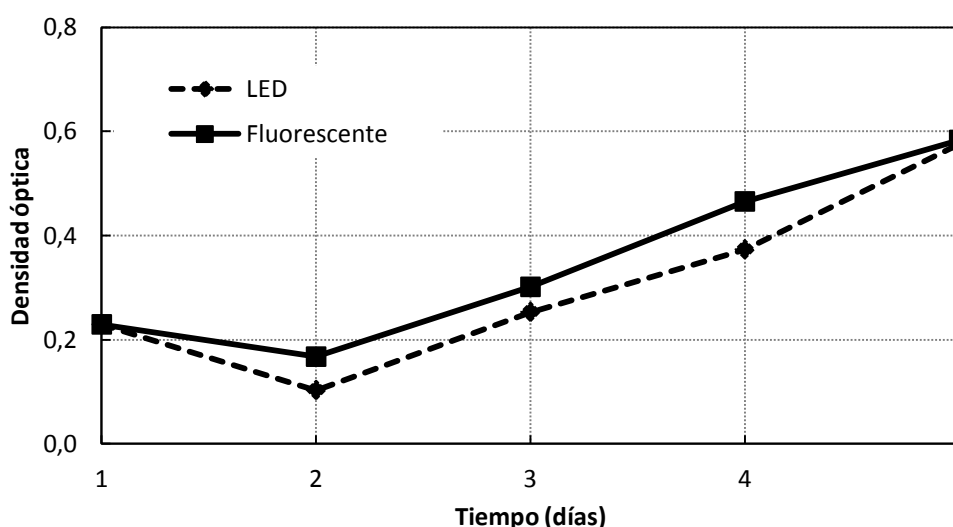


Fig. 42. Evolución diaria de la densidad óptica en la quinta experiencia. Por primera vez se muestra un descenso de la densidad en el segundo día. Pudo ser debido a que el inóculo madre se encontrara en fase senescente después de cinco semanas de experiencias. Al final el crecimiento se recupera y la densidad aumenta, aunque alcanza valores menores que en las otras experiencias. La curva correspondiente al testigo se encuentra siempre por encima de la del ensayo, igualándose al final del ciclo.

El pH en la experiencia mantuvo aproximadamente los valores iniciales durante los dos primeros días. En el caso del ensayo incluso descendió ligeramente. Después de esta fase se retomó el crecimiento hasta alcanzar los elevados valores usuales (Fig. 43). El pH del testigo fue mayor que el del ensayo hasta el final del ciclo dónde prácticamente se igualaron sus valores, al igual que ocurrió con la densidad óptica.

La conductividad eléctrica mostró una tendencia descendiente durante todo el ciclo. Los valores del ensayo se mantuvieron siempre por debajo de los del testigo (Fig. 44). La pendiente de la curva descendiente presenta cierta correspondencia con la evolución de la densidad óptica. Cuando la densidad óptica presentó un crecimiento negativo la pendiente de descenso de la CE es menor o prácticamente paralela al eje; y cuando el crecimiento es mayor la pendiente descendente de la curva de CE también lo es.

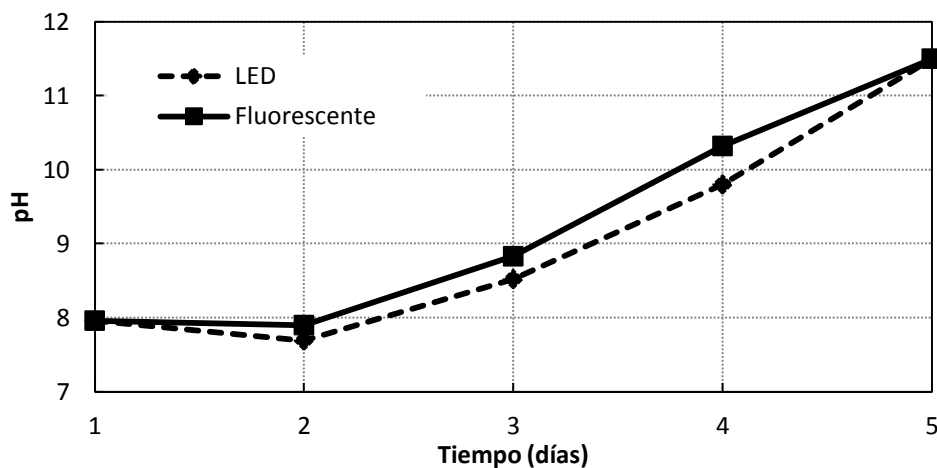


Fig. 43. Evolución diaria del pH en el quinto experiencia. Los valores en el segundo día se mantuvieron similares a los de partida. En el caso del ensayo el pH descendió un poco durante este día y el resto del ciclo se mantuvo siempre en valores por debajo del testigo, hasta prácticamente igualarse al final del ciclo.

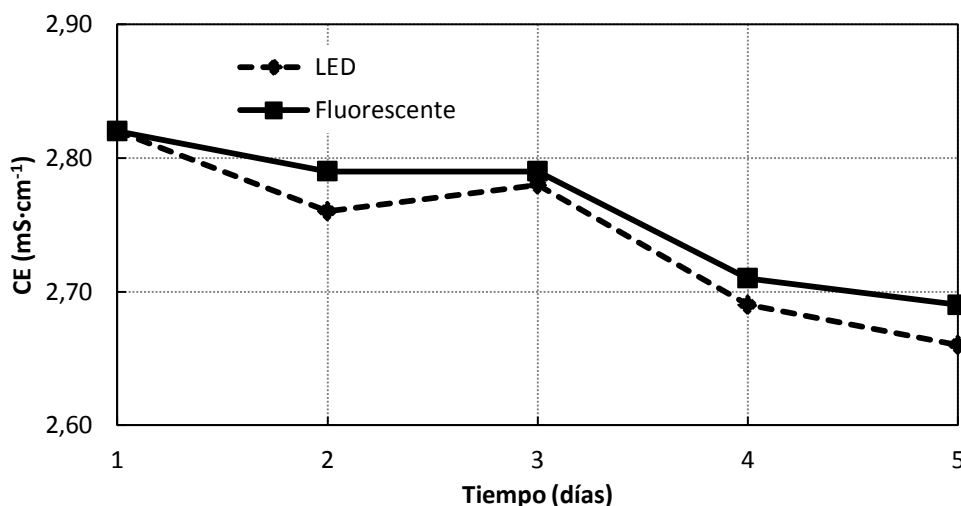


Fig. 44. Evolución diaria de la conductividad eléctrica en el quinto experiencia. Presentó una tendencia descendente durante todo el ciclo. La curva correspondiente al ensayo se mantuvo siempre por debajo de la del testigo.

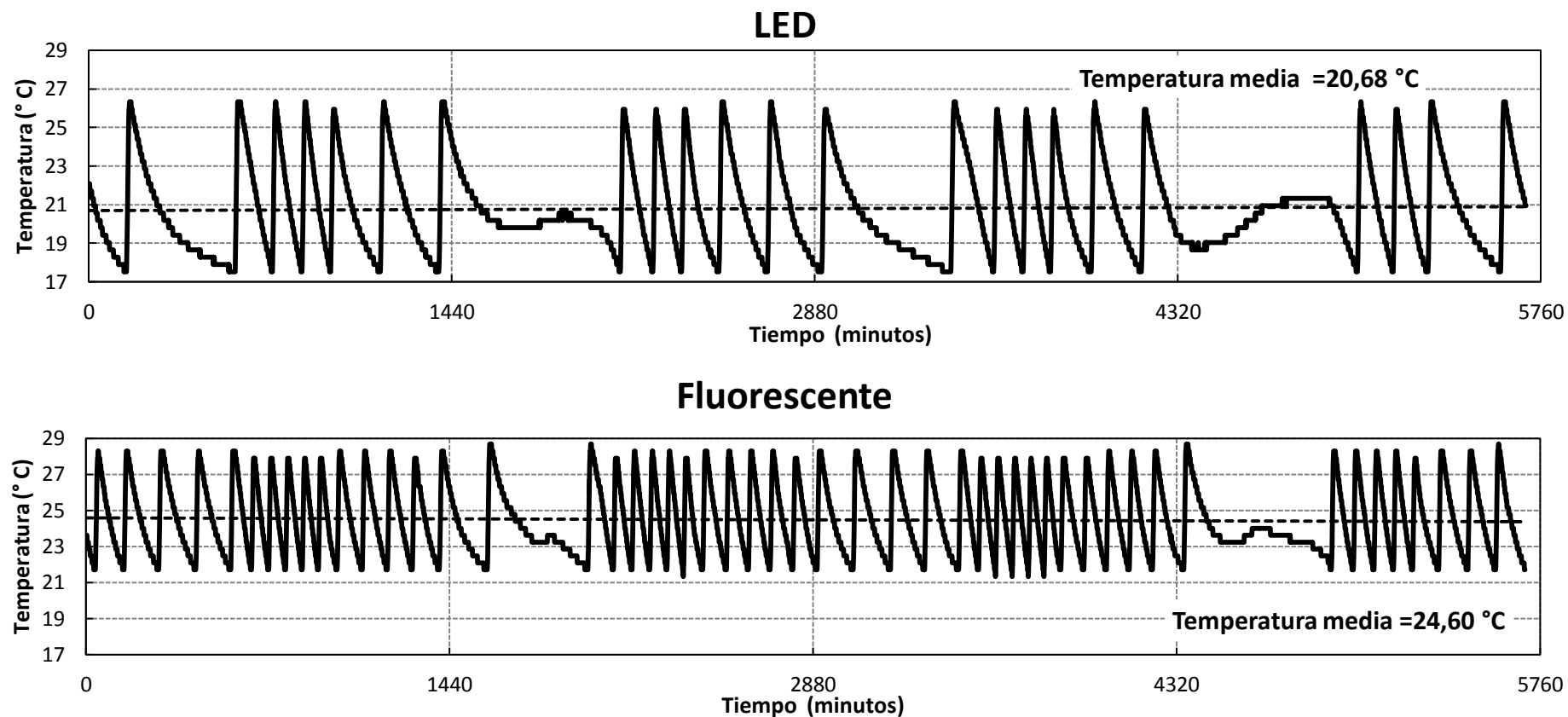
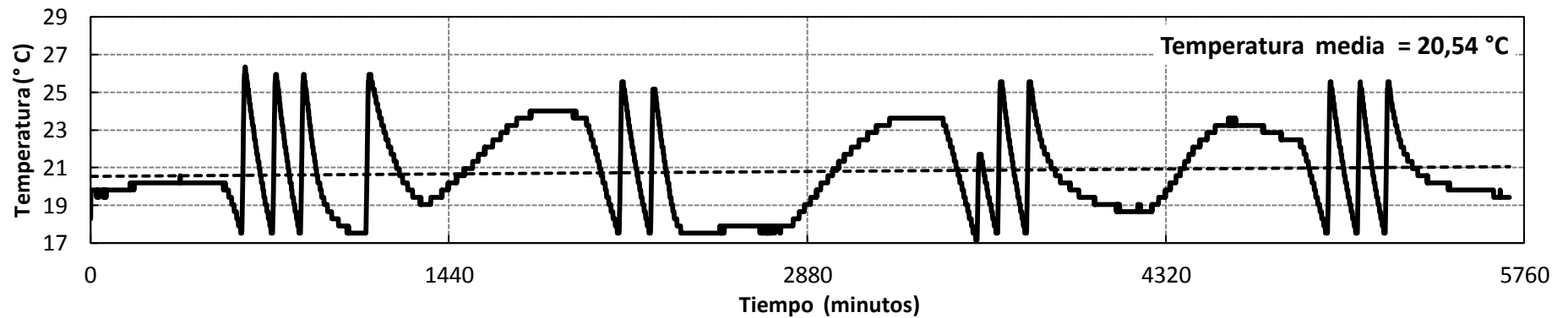


Fig. 45. Evolución de la temperatura en la segunda experiencia. A partir de esta semana se comenzó a disponer de los sensores de temperatura acoplados a un *Data-logger*. De esta forma se tomaron datos cada 60 segundos. Se pueden observar las oscilaciones que generan tanto el efecto día-noche como la inercia de los calefactores. El testigo presenta una temperatura media superior al ensayo. En el ensayo se alcanzan con frecuencia temperaturas inferiores a los 20 °C designados como límite inferior y en ambos se superan los 25 °C que se fijaron como límite superior.

LED



Fluorescente

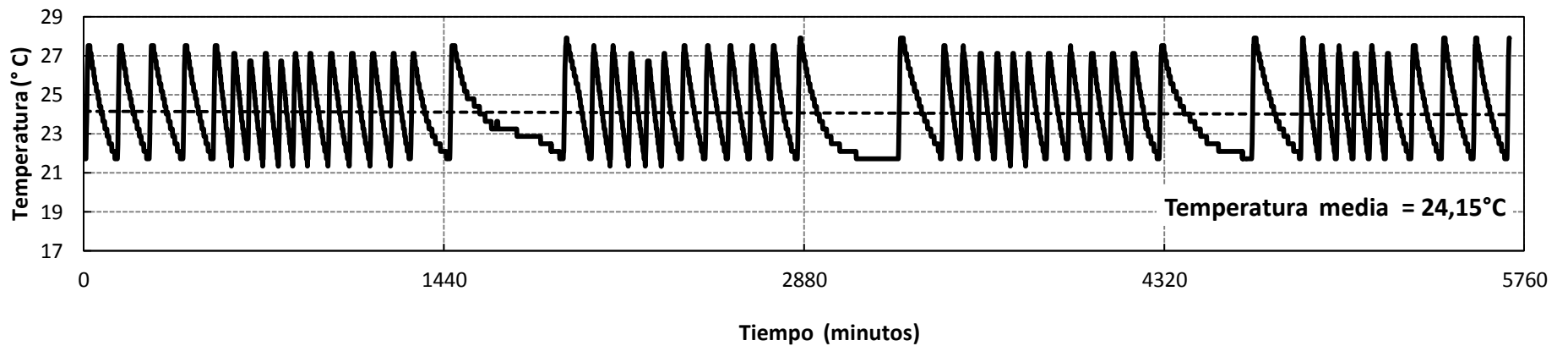


Fig. 46. Evolución de la temperatura en la tercera experiencia. La temperatura del testigo es superior a la del ensayo en aproximadamente 4°C. Se observan de nuevo las oscilaciones térmicas que se producen por el cambio día-noche y por la propia inercia del calefactor.

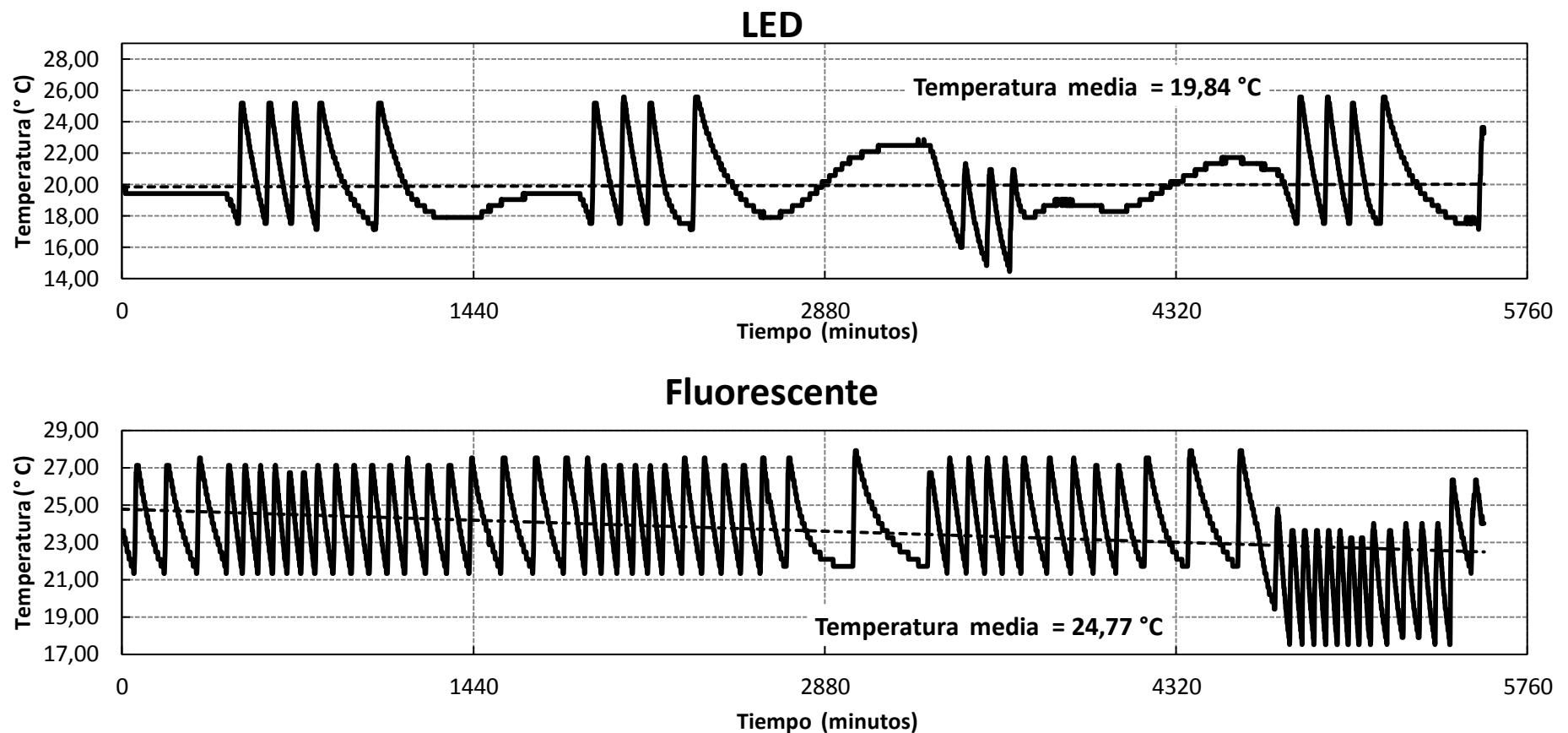


Fig. 47. Evolución de la temperatura en la cuarta experiencia. De nuevo se muestra que la temperatura del ensayo es 4 °C inferior a la del testigo y que se los valores del rango establecido (20 - 25 °C) son sobrepasados tanto superior como inferiormente. Cabe destacar que en el ensayo entre el tercer y el cuarto día las temperaturas estuvieron siempre por debajo de 22 °C llegando incluso a los 14 °C. En el testigo se observa también que entre el cuarto y el quinto día la temperatura osciló entre los 17 y los 23 °C durante gran parte del día. En ambos casos estas temperaturas inusuales se debieron a problemas puntuales con el calefactor.

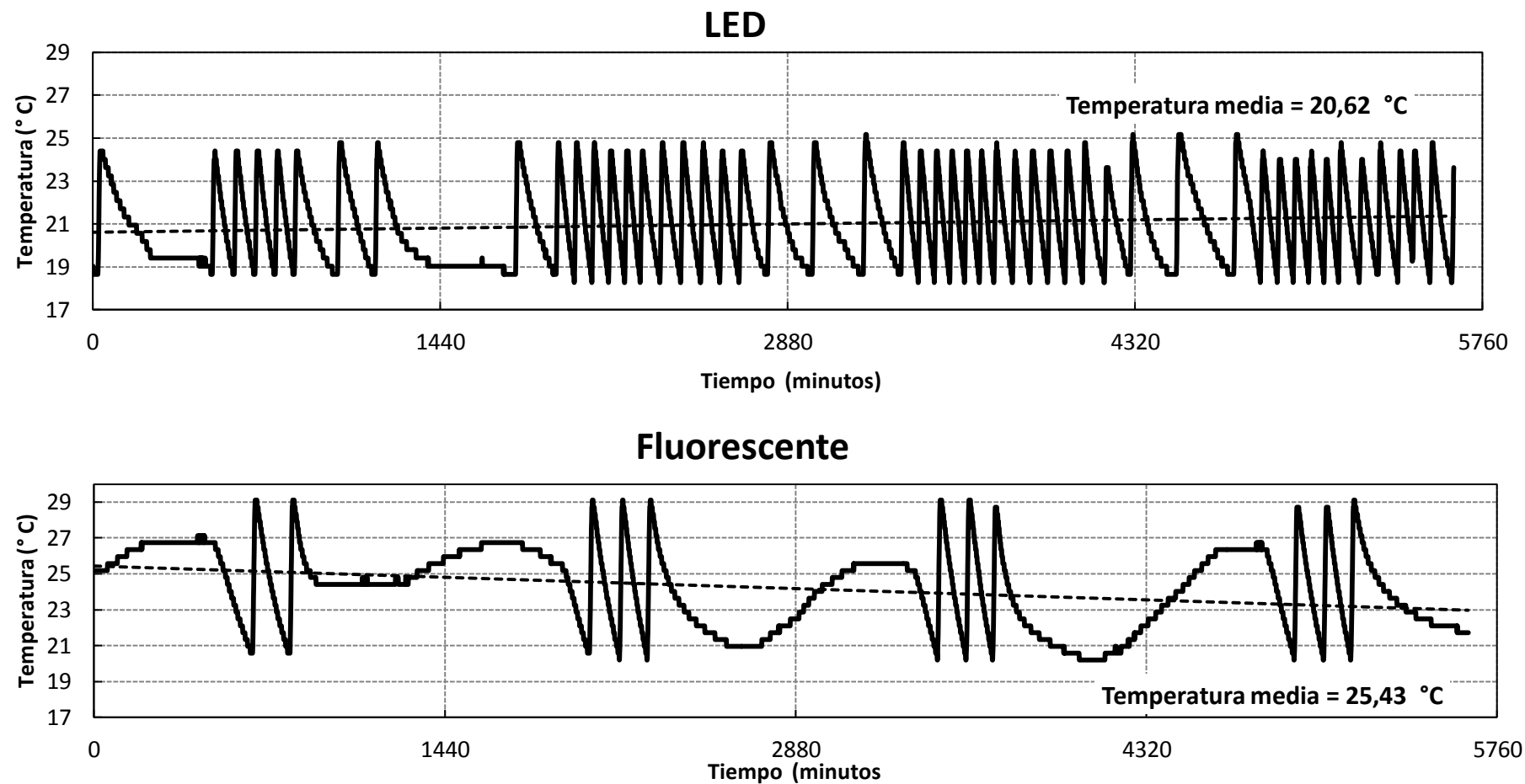


Fig. 48. Evolución de la temperatura en la quinta experiencia. Para esta experiencia el calefactor que usualmente se empleaba en el ensayo se cambió al del testigo y viceversa con el fin de observar si presentaban diferencias. Y es evidente que las curvas son características del calefactor que se emplee. El calefactor empleado usualmente para el ensayo y que se empleó en este caso para el testigo muestra una inercia térmica superior, tarda más en calentarse que el otro y es por eso que las "ondas de temperatura" son más amplias en este.

3.6. COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO SEMANAL.

Para poder evaluar el crecimiento entre las diferentes experiencias es necesario presentar los valores como relativos. De este modo los valores de cada experiencia se han relacionado con su testigo por un lado y por otro con el mayor valor alcanzado durante el experimento. De este modo se puede evaluar en qué caso se ha alcanzado el mayor crecimiento y en cuál la mayor diferencia entre testigo y ensayo.

3.6.1. CRECIMIENTO RELATIVO AL TESTIGO.

Para relacionar el crecimiento del ensayo con el del testigo se tomó como 0 % el valor de partida de la densidad óptica y como 100 % al valor final del ciclo en el testigo (Ecuación 1).

$$\mu_t = 100 \times \frac{X - X_i}{X_{ft} - X_i}$$

Ecuación 1. Tasa de crecimiento relativo al testigo (μ_t), dónde X_i sería el valor de la densidad óptica de partida y X_{ft} el valor de la misma en el último día del ciclo del testigo.

De este modo se puede observar cómo solo en el caso de la tercera experiencia (luz roja y azul, ambas al 50 % de intensidad) el crecimiento entre ensayo y testigo presenta diferencias notables. El crecimiento del ensayo es casi un 30 % superior al del testigo. En el resto de los casos los valores finales del crecimiento del ensayo se encuentran siempre ligeramente por debajo de los del testigo.

En las experiencias en las que la intensidad de iluminación alcanzó el 70 % (cuarta y quinta experiencia), se observa que el crecimiento al principio es lento o incluso negativo, caso de la quinta experiencia, pero que luego remonta y alcanza valores similares al resto de experiencias. La reducción de la densidad óptica en el segundo día de la última experiencia (luz roja al 30 % y luz azul al 70 % de intensidad) se muestra como un crecimiento negativo (Fig. 49). Aunque las diferencias con su testigo sean ligeramente superiores al resto, la biomasa generada es la menor de todas las experiencias (Fig. 50).

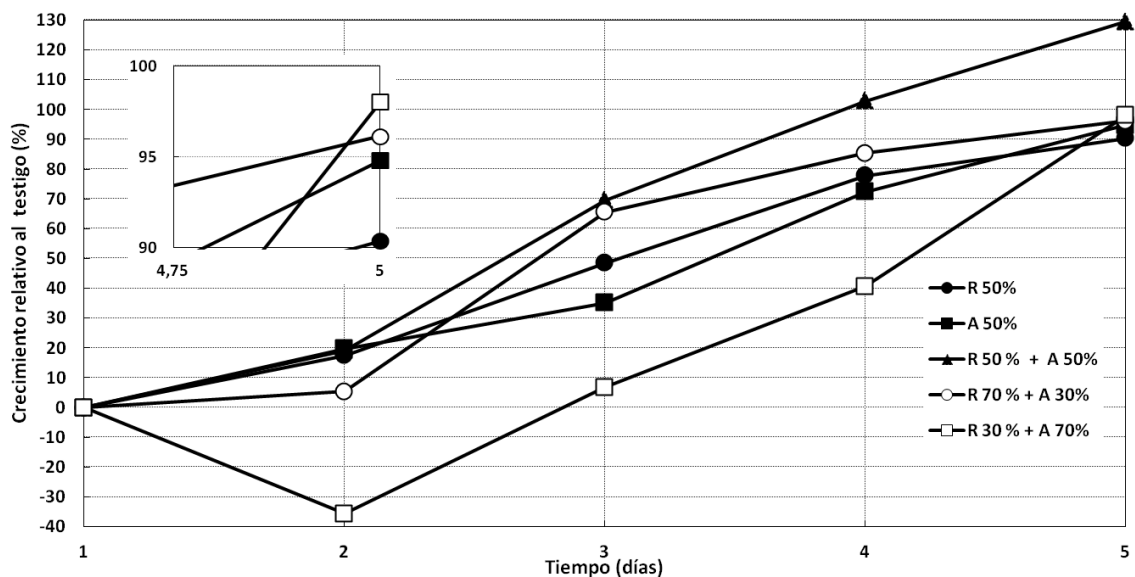


Fig. 49. Evolución diaria del crecimiento con respecto al testigo. En el caso de la tercera experiencia el crecimiento del ensayo es notablemente superior al del testigo. En el resto de los casos los valores finales de crecimiento del ensayo se mantienen ligeramente por debajo de los alcanzados por el testigo.

3.6.2. CRECIMIENTO RELATIVO AL MÁXIMO.

En este caso la comparación se hizo por un lado para el ensayo y por el otro para el testigo. Se tomó como 0 % el mínimo valor de partida de las cinco experiencias y como 100 % el máximo valor alcanzado. Puesto que el menor valor de partida es igual en ensayo y testigo (cuarta experiencia) sólo variaron los máximos, aunque los dos se alcanzaron en la primera experiencia.

$$\mu_r = 100 \times \frac{X - X_m}{X_M - X_m}$$

Ecuación 2. Tasa de crecimiento relativo al máximo (μ_r), donde X_m es el mínimo valor de la densidad óptica de partida de las cinco experiencias y X_M el máximo valor. Se calculó por separado para ensayo y testigo.

3.6.2.1. EVALUACIÓN DEL ENSAYO.

El mayor crecimiento se alcanzó en la primera experiencia en la que se empleó solo luz roja al 50 % de intensidad. Se observa que los mayores valores se alcanzan cuando está presente la luz roja al 50 % de intensidad, como es el caso del primer y el tercer ensayo (Fig. 50) y es la combinación de luz roja y azul a la mitad de intensidad la que muestra los mejores resultados en relación con el testigo (Fig. 49).

En presencia de luz azul el crecimiento comienza a ser menor, siendo menor cuanto mayor sea la intensidad de la misma. El quinto ensayo, con un 70 % de luz azul, presenta un crecimiento menor que las demás experiencias en las que hay luz azul, sola o combinada, y además presenta el menor crecimiento de todas las experiencias. La combinación de mayor intensidad de luz azul y menor de luz roja hacen que el crecimiento sea menor. En este caso se observa también cómo para las experiencias en las que la luz se aplicó al 70 % de intensidad el inicio del cultivo presenta un crecimiento lento o negativo y luego remonta.

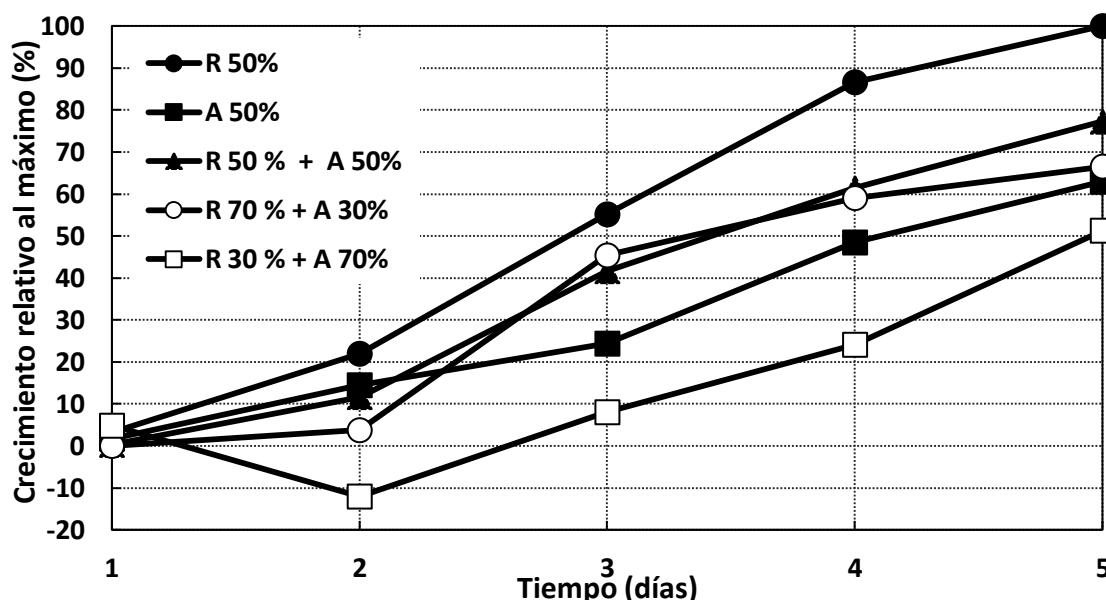


Fig. 50. Crecimiento del ensayo relativo al máximo. El mayor crecimiento se obtiene en la primera experiencia. La cuarta y quinta experiencia muestran un crecimiento inicial lento o negativo, respectivamente, para luego remontar. Las experiencias en las que se aplicó luz roja al 50 % mostraron el mayor crecimiento.

3.6.2.2. EVALUACIÓN DEL TESTIGO.

En este caso se observan ligeras diferencias con la evaluación del ensayo, pero al igual que en esta el mayor crecimiento se alcanza en la primera experiencia. La tercera experiencia, en la que se presentó la mayor diferencia entre ensayo y testigo, se muestra en este caso muy por debajo del mayor valor, al contrario de cómo se observó en la evaluación del ensayo. Hay una diferencia prácticamente de un 30 % entre ellos.

En el cuarto y quinto ensayo se observa de nuevo un crecimiento ralentizado e incluso negativo en el quinto ensayo. Los valores de reducción del crecimiento son inferiores a los que se alcanzaron en el ensayo. Al igual que en los casos anteriores esta fase se supera y alcanzan valores normales en relación con los alcanzados por el resto de experiencias, salvo la primera que como ya se ha dicho alcanza el mayor valor.

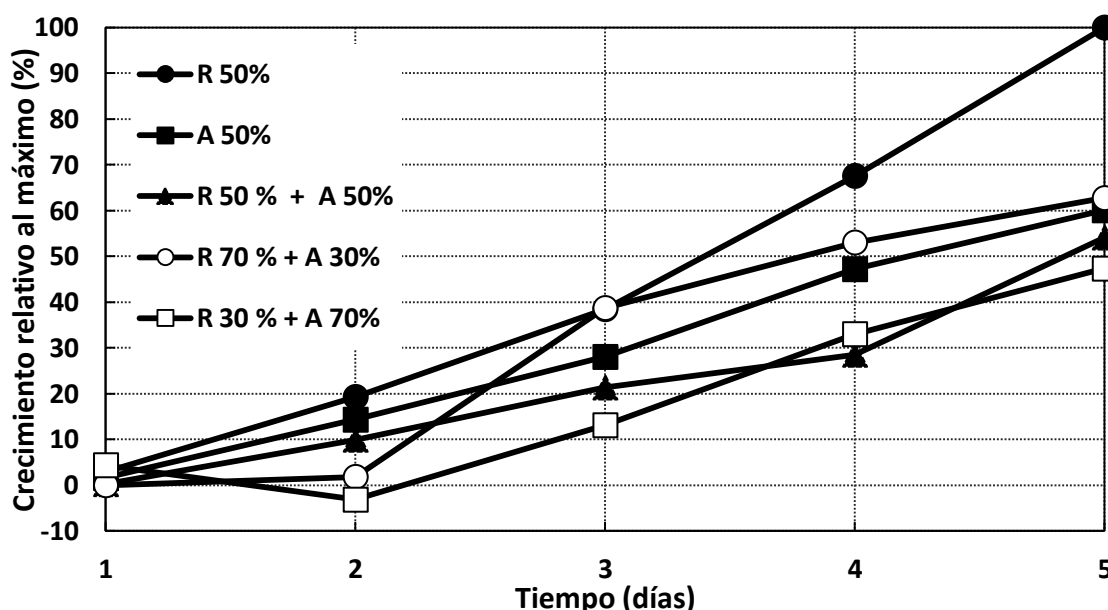


Fig. 51. Crecimiento del testigo relativo al máximo. El mayor crecimiento se obtiene en la primera experiencia. La cuarta y quinta experiencia muestran un crecimiento inicial lento o negativo, respectivamente, para luego remontar. La reducción del crecimiento en la quinta experiencia es menor que en el caso del ensayo.

Los resultados de mayor interés son los que hacen referencia a la diferencia entre ensayo y testigo ya que de esta manera se evalúa la influencia de los LEDs en el cultivo. De este modo, el mejor resultado se obtiene cuando se emplea la iluminación combinada al 50 % (tercera experiencia). En la primera experiencia se obtuvo la mayor producción de biomasa, pero los valores fueron similares entre el ensayo y el testigo por lo que no es relevante para la evaluación de la aplicación de los LEDs; pero sí muestra la potencialidad de un inóculo joven.

El empleo de la iluminación combinada genera los mejores resultados y esto es debido probablemente a que el pigmento dominante en la especie empleada *Chlorella sorokiniana* es la clorofila a (*Chl a*). El espectro de absorción de la especie muestra dos regiones en las que la absorción es máxima: entorno a los 450 nm y entorno a los 680 nm (Fig. 52). El empleo de iluminación monocromática provoca resultados menores debido a que solo se produce absorción en una zona concreta. A pesar de que la zona correspondiente al azul presente valores mayores de absorción, lo cierto es que la producción de biomasa con luz azul ofrece los peores resultados, debido principalmente a que en la asimilación de

fotones de luz azul se pierde mucha energía (Fernández, 1982; Barceló-Coll, et al., 2001). La absorción de fotones de la región del rojo se produce de una manera más efectiva, aunque el pico de absorción sea menor, porque la cantidad de energía que aportan se encuentra más próxima a la necesaria para desencadenar los procesos fotosintéticos (Barceló-Coll, et al., 2001).

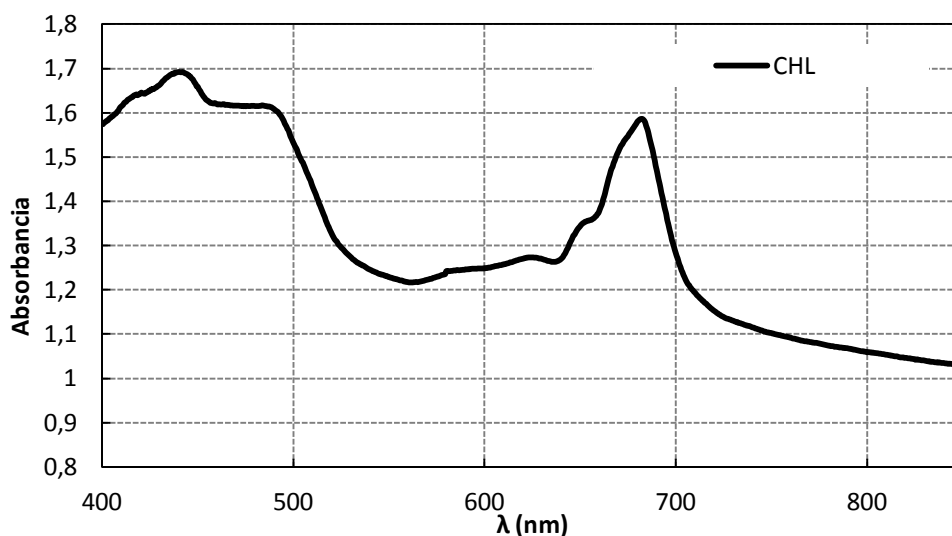


Fig. 52. Espectro de absorción de la especie empleada (*Chlorella sorokiniana*), en la que se aprecian los máximos de absorción en la región del azul (entorno a 450 nm) y rojo (entorno a 660 nm).

El aumento de la PFD no se traduce en un aumento de la producción de biomasa, ya que como se ha visto es más influyente calidad que la cantidad de luz aportada (Fig. 53).

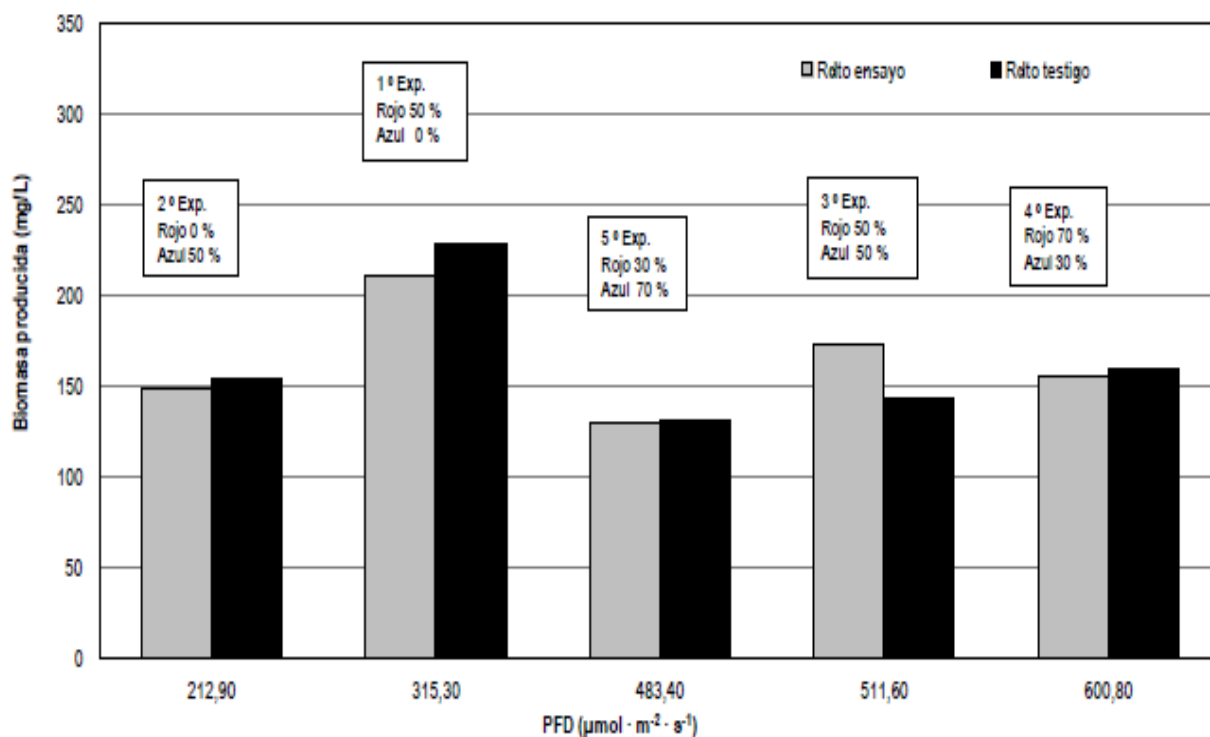


Fig. 53. Biomasa final producida en función de la PFD (del inglés, *Photosynthetic Flux Density*) en las diferentes experiencias llevadas a cabo.

Tabla 4. Resumen de la intensidad aplicada en cada experiencia y de la producción final obtenida (mg/L) así como la comparación entre el ensayo y el testigo.

Exp.	Intensidad (%)		PPFD ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)		Producción final (mg/L) ²		Biomasa inicial (mg/L)	Diferencia Ensayo - Testigo (mg/L)	Relación Ensayo/Testigo
	Rojo	Azul	Exterior	Interior ¹	Ensayo	Testigo			
1	50	0	315,30	186,97	211,63	228,97	48,86	-17,34	0,90
2	0	50	212,90	106,87	149,27	154,90	46,38	-5,63	0,95
3	50	50	511,60	277,28	173,36	143,86	43,90	29,49	1,30
4	70	30	600,80	325,63	155,35	159,85	43,45	-4,50	0,96
5	30	70	483,40	262,00	129,68	131,26	51,56	-1,58	0,98

¹. La PFD interior se ha calculado de acuerdo con el estudio llevado a cabo de la atenuación de la luz en el medio del cultivo. Se corresponde con el valor que tendría la PFD en el interior del cono para una densidad óptica del cultivo de 0,66 unidades de absorbancia. Se calculó como el 59,3 % del PFD en el exterior cuando la iluminación es con el LED rojo únicamente; 50,2 % en el caso de emplear solo el LED azul y 54,2 % cuando es iluminación mixta.

². La producción final de biomasa se calculó de acuerdo con el estudio llevado a cabo en el [Anexo II](#), mediante el cual se puede relacionar la densidad óptica con la concentración de biomasa, siempre que la densidad óptica presente valores comprendidos entre 0 y 1,5 unidades de absorbancia. Para ello se empleó la fórmula $y = 225,14 \cdot x$; donde x se corresponde con la densidad óptica e y con la concentración de biomasa (mg/L).

Los resultados obtenidos en los primeros días de la cuarta y quinta experiencia se podrían interpretar como efectos de fotoinhibición y fotoadaptación posterior debido a la alta intensidad lumínica que se empleó en esos casos. Pero el hecho de que ocurra lo mismo en el ensayo y en el testigo hace suponer que no es esta la razón ya que la intensidad empleada en el testigo es muy inferior a la del ensayo. Es por ello que se puede concluir que la razón de este evento sea debida a que el cultivo madre estuviera alcanzando la fase de senectud.

En la quinta experiencia sí que se observa que en el ensayo se produce una reducción de la biomasa mayor que en el testigo, por lo en este caso sí que se puede aducir el efecto de fotoinhibición por altas intensidades como razón de la diferencia en la reducción del crecimiento entre ensayo y testigo.

3.7. RELACIÓN ENTRE LA EVOLUCIÓN DE LA DENSIDAD ÓPTICA Y LOS DISTINTOS PARÁMETROS EVALUADOS (PH Y CE).

Para la evaluación de estos parámetros se utilizaron los datos diarios de densidad óptica, pH y CE de todas las experiencias. Se diferenció entre ensayo y testigo. En el caso del quinto ensayo los valores negativos se asumieron como crecimiento cero con el fin de no complicar la evaluación de la tendencia.

3.7.1. DENSIDAD ÓPTICA Y PH.

En la evaluación de cada experiencia por separado se observó como el pH aumentaba a lo largo del ciclo, al igual que lo hacía la densidad óptica, por ello se esperaba alguna relación entre ellos. Se observa como en ambos casos (ensayo y testigo) se presenta una relación lineal entre el aumento de la densidad óptica y del pH. Esta relación es prácticamente la misma ya que el valor de la pendiente difiere

ligeramente a partir de las milésimas, siendo superior en el caso del ensayo, y el valor del término independiente difiere a partir de las centésimas, siendo superior para el caso del testigo. El valor del coeficiente de regresión (R^2) es superior en el testigo (Fig. 55).

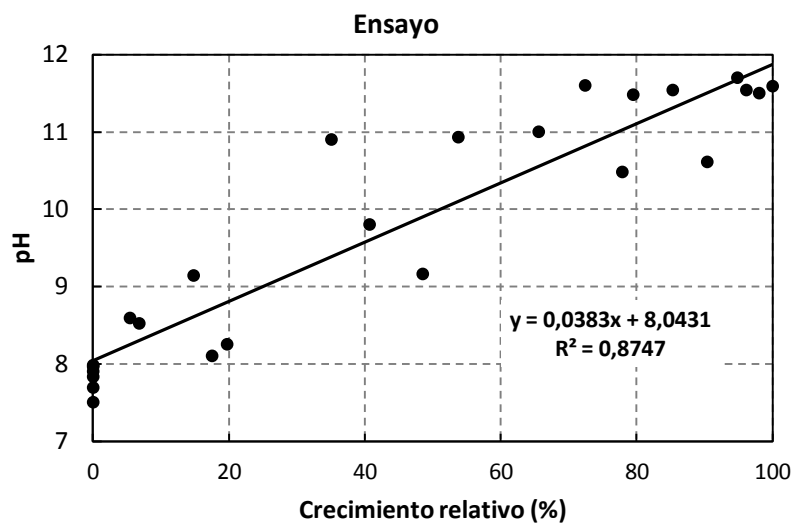


Fig. 54. Relación entre el aumento de la densidad óptica y el aumento de los valores de pH en el ensayo. Hay una clara relación entre ambos parámetros ya que presentan un alto índice de correlación (R^2).

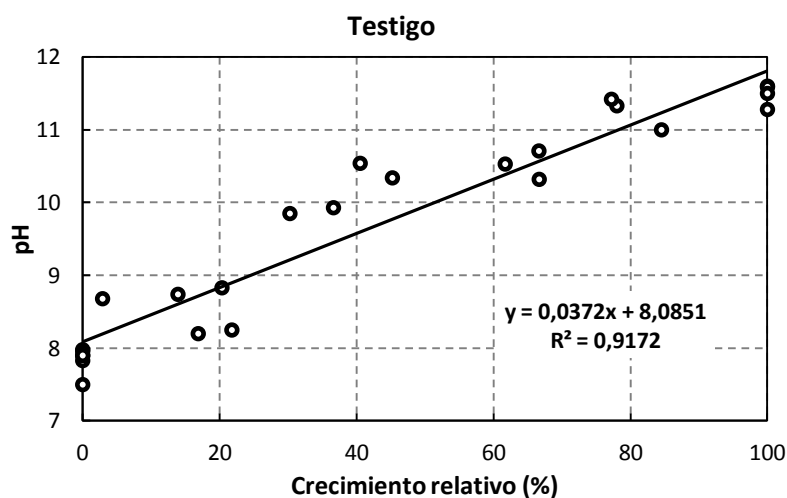


Fig. 55. Relación entre el aumento de la densidad óptica y el aumento de los valores de pH en el testigo. Los dos parámetros presentan un alto índice de correlación.

El aumento del pH a lo largo del cultivo se debe principalmente a que no se aplicó CO_2 . Sin CO_2 el pH del cultivo se dispara debido a la retirada de CO_2 de los iones bicarbonato (Abalde, et al., 1995). Estos niveles de pH hacen que el crecimiento esté muy limitado, lo que podría explicar los resultados relativamente bajos de producción. La producción con suplemento de CO_2 es muy superior a la que se puede obtener si no se aplica. La inclusión de un 5% (v/v) de CO_2 en la aireación supone prácticamente triplicar la producción máxima (Kumar & Das, 2012). Es preciso remarcar que la adición de CO_2 no puede ser ilimitada porque concentraciones muy altas suponen daños a las microalgas.

Por otro lado con valores de pH superiores a 10 puede comenzar la formación de precipitados insolubles de carbonato cálcico (Abalde, et al., 1995). Estos precipitados pueden servir como punto de inicio para que las microalgas se agreguen formando flóculos.

3.7.2. DENSIDAD ÓPTICA Y CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (CE).

Entre la densidad óptica y la conductividad eléctrica, al contrario que en el caso del pH, no hay ninguna relación (Fig. 56). Los valores de CE siguen una tendencia errática a lo largo de las experiencias por lo que no cabía esperar que hubiera relación entre CE y DO.

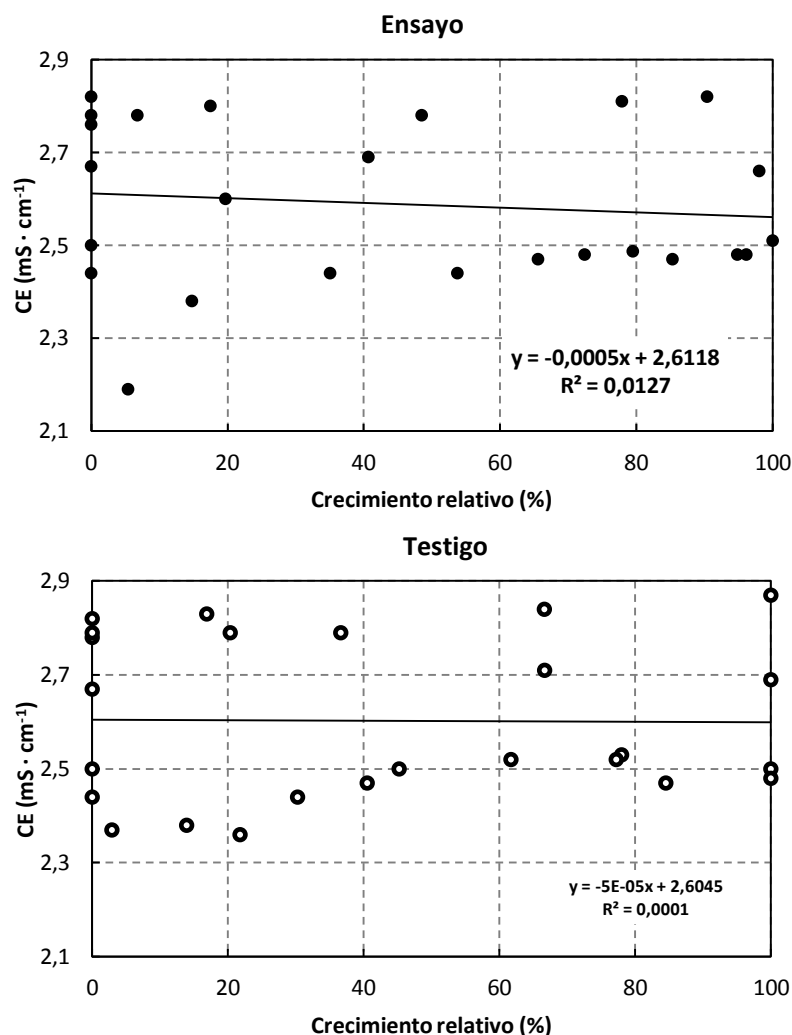


Fig. 56. Relación entre la conductividad eléctrica y la densidad óptica. Se observa que no hay ninguna relación entre los dos parámetros.

La medida de la conductividad eléctrica se tomó con la intención de hacer un seguimiento indirecto de la evolución de los nutrientes. Los resultados obtenidos no muestran sin embargo ninguna tendencia. Al tratarse de un sistema de organismos vivos en continua evolución la medida realizada en un momento puntual no puede dar siquiera una idea de cómo es la evolución de la concentración de sales.

3.8. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE NUTRIENTES CON EL EQUIPO CLEANGROW.

La evaluación del contenido de nutrientes no fue concluyente debido a que el rango de pH fue demasiado elevado para que las lecturas tomadas con el equipo fueran correctas.

El rango de pH de la Tabla 5 es el indicado para cada ión por separado de modo que solo las medidas de cloruros y nitratos se encontrarían dentro de rango ya que al final del ciclo se alcanzaban frecuentemente valores de pH entre once y doce. La evaluación de estos valores (Fig. 57) presenta tendencias erráticas que no se pueden relacionar con ningún otro parámetro evaluado. Es por esta razón por la que se decidió prescindir estos datos.

Tabla 5. Rango de pH correcto para cada ión del equipo CleanGrow. El pH alcanzado en las experiencias fue demasiado elevado para que las medidas realizadas fueran válidas.

Ión	Rango pH correcto	
	Min.	Máx.
Cloruro	2	12
Sodio	1	9
Amonio	4	8,5
Nitrato	2	11
Calcio	3,5	8
Potasio	1	9

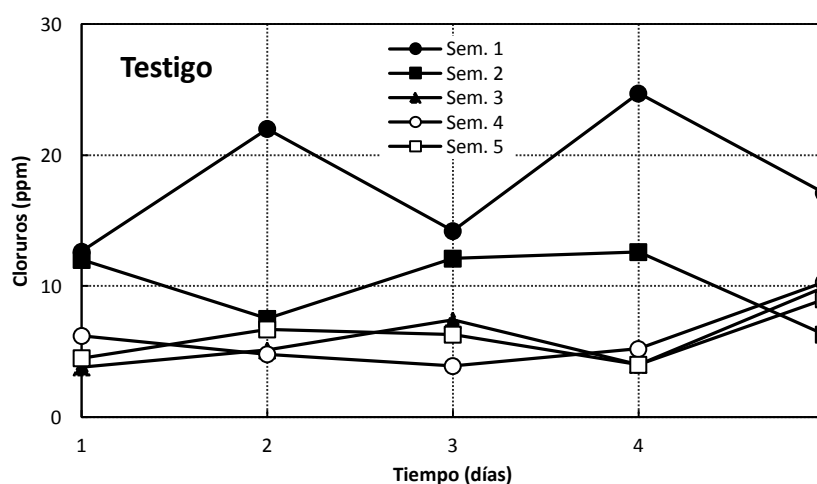


Fig. 57. Evolución diaria del contenido de cloruros en las cinco semanas de experiencias, según las medidas realizadas en el testigo con el electrodo selectivo de iones CleanGrow. Las curvas presentan una tendencia errática, lo que hizo que los valores obtenidos se desestimaran.

3.9. EVALUACIÓN DE LA RADIACIÓN FOTOSINTÉTICAMENTE ACTIVA (PAR).

La evaluación de la PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) se llevó a cabo en varias fases. Por un lado se examinó la PAR de los LEDs a diferentes distancias y en diferentes posiciones para todas las intensidades, con un sensor de PAR plano (LI-190, LiCOR).

La siguiente fase consistió en introducir el sensor de PAR plano en el cono de cultivo, debidamente protegido, y hacer medidas en el extremo del cono y en el centro del mismo, para las diferentes intensidades de los LEDs. También se hicieron medidas en las mismas posiciones iluminando con la

lámpara fluorescente tubular que se empleó en los ensayos. En esta fase se constató que con este sensor plano, la medida de la PAR que penetra hasta el centro del cono no es la real, ya que solo se tiene en cuenta la radiación emitida por una cara de la plataforma de soporte de los LEDs.

Debido a esta constatación, la siguiente fase consistió de nuevo en evaluar la PAR en el interior del cono de cultivo, pero esta vez con un sensor de PAR esférico (LI-193, LiCOR). En este caso se evaluó la PAR a diferentes alturas en el cono para todas las intensidades, y también se evaluó la lámpara fluorescente tubular.

Por último, se llevó a cabo la evaluación de la PAR en función de la densidad óptica del cultivo, para cada nivel de intensidad de los LEDs. En este caso en lugar de los conos de cultivo se emplearon recipientes tubulares de distinto diámetro. Se partió de un cultivo con una densidad óptica alta y se fue diluyendo la solución.

3.9.1. EVALUACIÓN DE LA PAR EN FUNCIÓN DE LA DISTANCIA Y LA POSICIÓN DEL SENSOR PLANO, PARA DIFERENTES INTENSIDADES DE LOS LEDs.

Para poder situar el sensor de PAR plano en las posiciones y distancias deseadas se construyó una pértiga (Fig. 58) en la que se incluyó una pinza al final del vástago para la sujeción del sensor. Se hicieron medidas en dos posiciones: con el sensor enfrente al foco y con el sensor entre dos focos, cada centímetro desde 0 a 6 cm. Se evaluaron las barras de LEDs roja y azul.

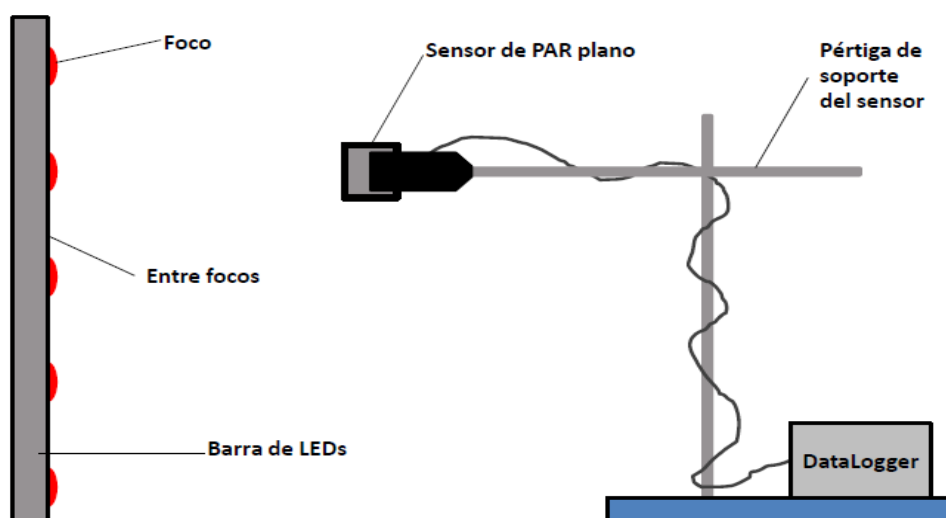


Fig. 58. Representación esquemática del sistema empleado para la realización de las medidas de PAR. Se fabricó una pértiga en cuya parte final se situaron unas pinzas para la sujeción del sensor. Se hicieron medidas cada centímetro desde 0 a 6 cm en dos posiciones distintas: con el sensor enfrente al foco y con el sensor entre dos focos.

Las medidas realizadas con el sensor enfrente al foco ofrecieron los mayores resultados, siendo superiores aquellos en los que el sensor estaba a la mínima distancia. Al aumentar la distancia entre foco y sensor los valores se fueron reduciendo. Al contrario ocurre en el caso de hacer las medidas con el sensor entre dos focos. Los valores son crecientes según aumenta la distancia, debido a que el sensor se va introduciendo poco a poco en la región afectada por los haces de luz de los dos focos entre los que se encuentra (Fig. 59 a Fig. 62).

La medida de la PAR entre focos presentó la dificultad de situar siempre el sensor a la misma distancia entre los dos focos. Es por ello que algunos valores obtenidos, como la curva de la posición 5 del *dimmer* (Fig. 60), difieren ligeramente de lo esperado. En este caso la curva 5 debería estar situada por encima de la 3 y por debajo de la 7 en los primeros 30 mm. A partir de 30 mm presenta la situación que se le suponía.

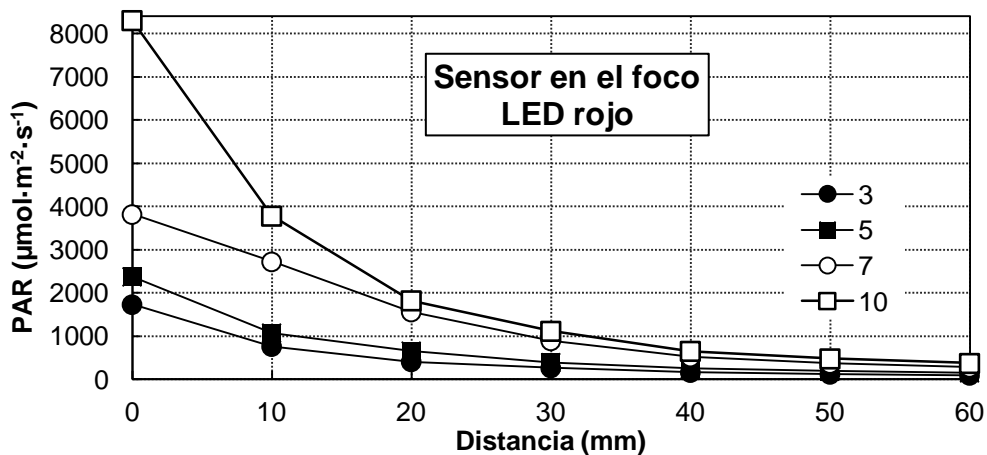


Fig. 59. Evolución de los valores de PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) en el LED (*Light Emitting Diode*) rojo, en función de la distancia cuando se sitúa el sensor enfrente al foco para varias posiciones del *dimmer*.

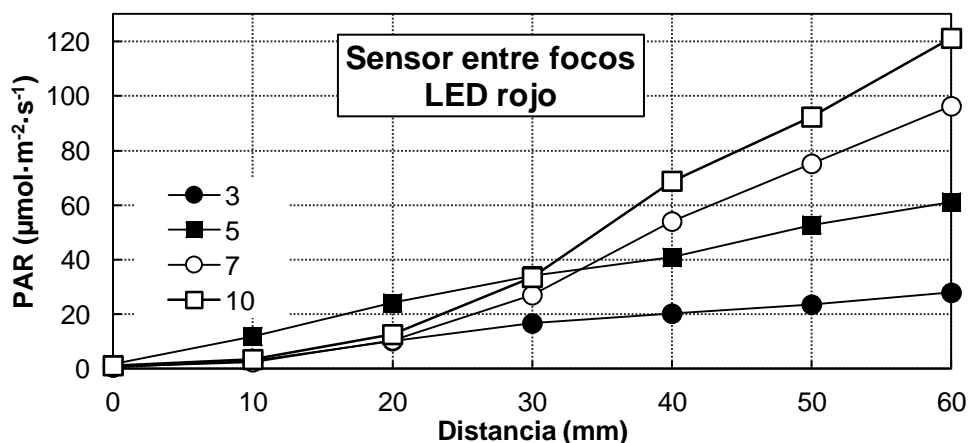


Fig. 60. Evolución de los valores de PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) en el LED (*Light Emitting Diode*) rojo, en función de la distancia cuando se sitúa el sensor entre focos para varias posiciones del *dimmer*.

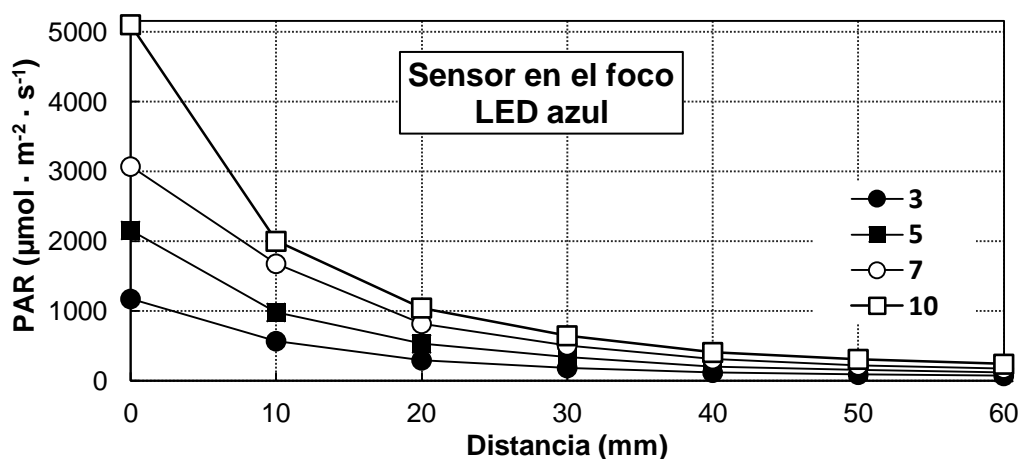


Fig. 61. Evolución de los valores de PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) en el LED (*Light Emitting Diode*) azul, en función de la distancia cuando se sitúa el sensor enfrente al foco para varias posiciones del dimmer.

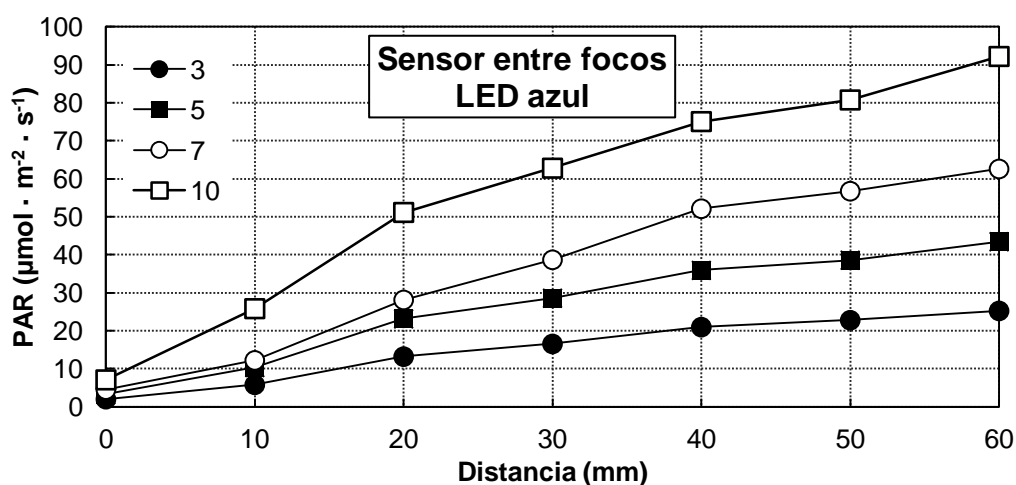


Fig. 62. Evolución de los valores de PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) en el LED (*Light Emitting Diode*) azul, en función de la distancia cuando se sitúa el sensor entre focos para varias posiciones del dimmer.

La distribución de la luz en los primeros centímetros varía enormemente en función de la posición. A tres centímetros entre focos la PAR en el LED rojo se encuentra entre 20 y 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, en cambio si la medida se toma en el foco la PAR alcanza valores entre 500 y 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. A distancias superiores a 60 mm la posición del sensor no presenta una gran influencia en los valores de PAR obtenidos. La medida a 60 mm del sensor entre focos en el LED rojo se sitúa entre 25 y 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y para la medida en el foco entre 90 y 350 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. La tendencia de las medidas en el foco es a disminuir mientras que entre focos la tendencia es creciente, por lo que se puede suponer que en distancias superiores los valores serán muy similares.

Se alcanzan valores muy altos de PAR cuando se mide con el sensor directamente enfrente al foco, pero estos valores rápidamente comienzan a disminuir. La PAR pasa de 8310 a 370 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ en una distancia de 60 mm.

Por otro lado se constató que la luz azul presenta para todos los casos menor PAR que la luz roja.

3.9.2. EVALUACIÓN DE LA PAR EN FUNCIÓN DE LA DISTANCIA DEL SENSOR PLANO CUANDO SE ENCUENTRA SUMERGIDO EN EL CONO DE CULTIVO, PARA DIFERENTES INTENSIDADES DE LOS LEDs.

El sensor se introdujo en una bolsa de plástico transparente con el fin de que no sufriera daños. Se comprobó que las medidas realizadas con el sensor introducido en la bolsa y fuera de ella no diferían significativamente. La pértiga empleada en la experiencia anterior se amplió con otro vástago (Fig. 63). Se evaluaron la luz roja, la azul y las dos juntas, además de la lámpara fluorescente tubular.

Se llevaron a cabo medidas en dos posiciones diferentes: el centro y el extremo del cono a una altura de 40 cm. La distancia entre el foco y el extremo del cono fue de 3,5 cm, y entre el foco y el centro de 6,5 cm. La medida del extremo se corresponde con la PAR que llega a las primeras partes del cono y la del centro con la PAR restante al atravesar el cultivo. De esta manera se hizo una primera tentativa de evaluación de la atenuación que sufre la luz al atravesar el cultivo.

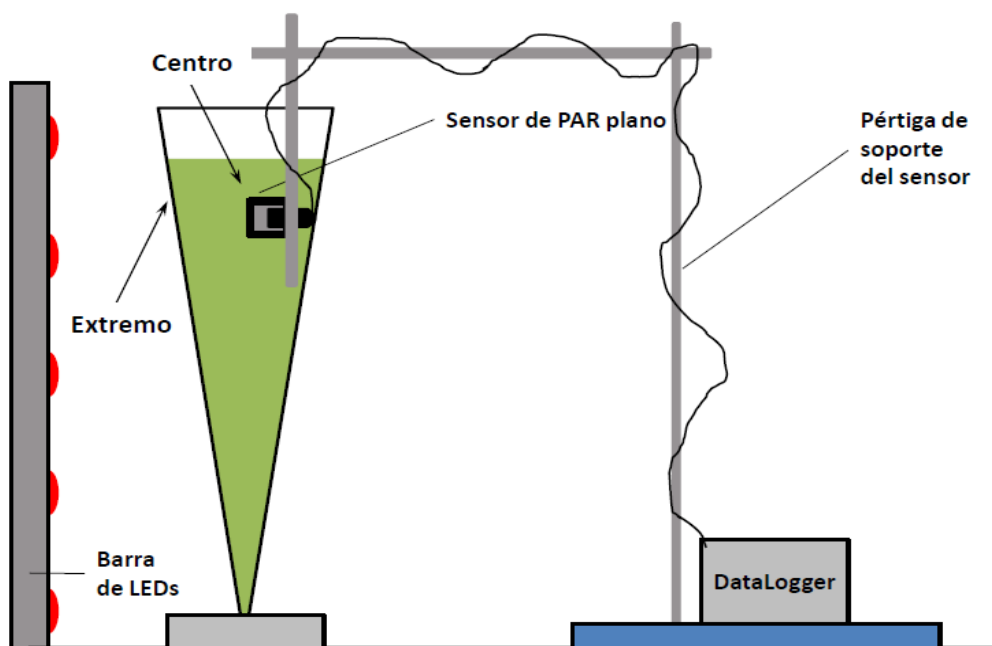


Fig. 63. Representación esquemática del sistema empleado para la realización de las medidas de PAR con el sensor sumergido. Se fabricó una pértiga de tres vástagos en cuya parte final se situaron unas pinzas para la sujeción del sensor. Se hicieron medidas en dos posiciones: extremo y centro del cono empleando luz roja, azul y ambas a distintas intensidades; también se evaluó la lámpara fluorescente tubular. El sensor se protegió adecuadamente con una bolsa de plástico transparente.

En el extremo del cono los valores más altos de PAR se obtuvieron para el caso de la evaluación de la combinación de luz roja y azul. Los valores de esta superan a la suma de los resultados obtenidos en la evaluación de cada luz por separado. La luz azul presenta registros mayores que la luz roja en este caso, pero cuando se evalúa en el centro del cono se observa cómo la luz roja tiene valores superiores, por lo que se puede inferir que la capacidad de penetración de la luz roja es superior a la de la luz azul.

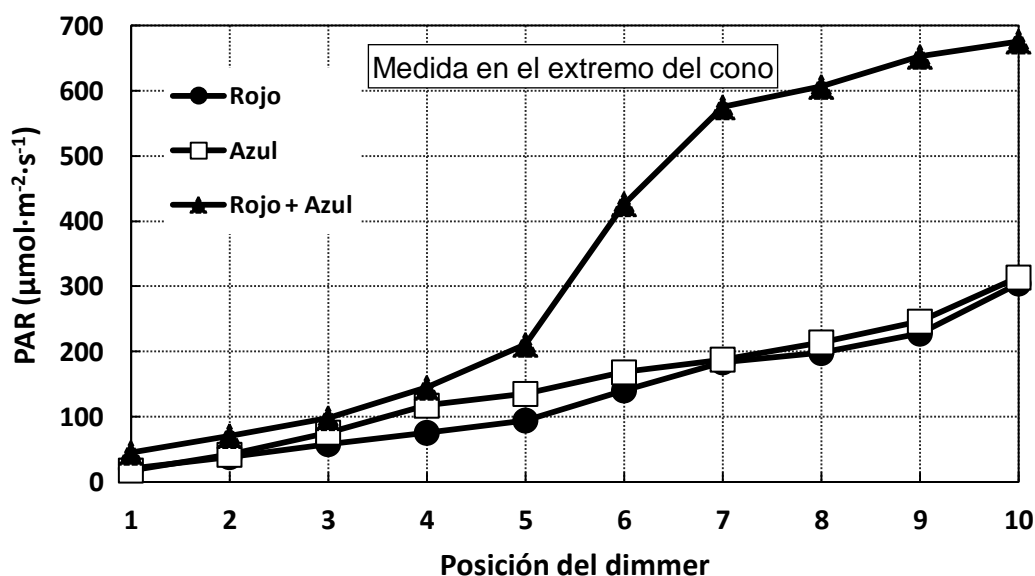


Fig. 64. PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) medida en el extremo del cono. La combinación de ambas luces da como resultado valores de PAR superiores a la suma de los valores con cada luz individualmente. La luz azul registra valores ligeramente superiores a la roja.

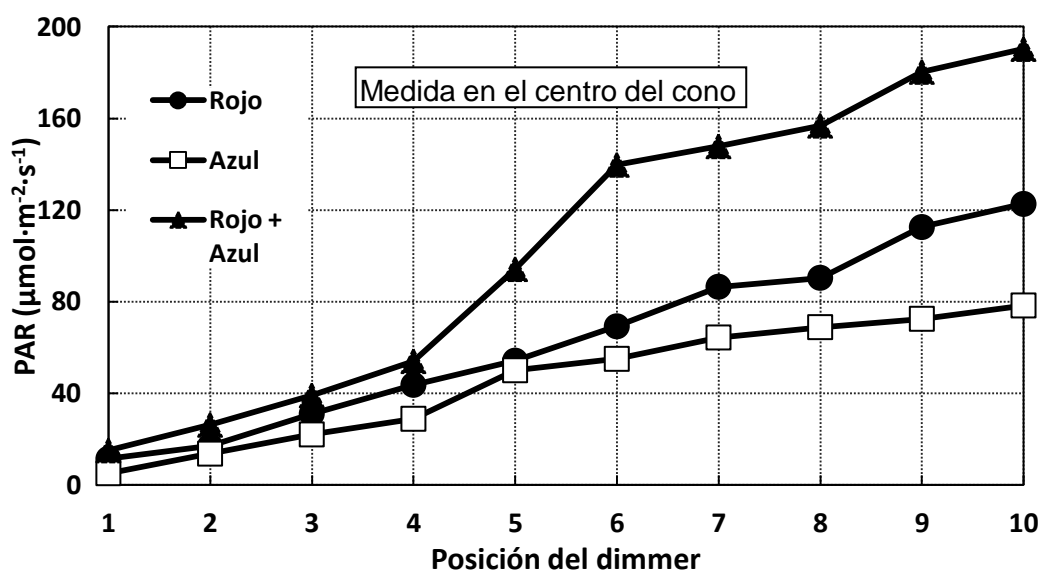


Fig. 65. PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) medida en el centro del cono. La combinación de ambas luces registra de nuevo el mayor valor, pero en este caso no es superior a la suma de los valores individuales. Los valores registrados por la luz roja superan a la luz azul, al contrario que en el caso de la evaluación de la incidencia en el extremo del cono.

Si evaluamos las curvas de cada color por separado (Fig. 67) se observa que los valores obtenidos de la medida en el extremo y en el centro difieren notablemente en todos los casos. Es el caso del LED rojo en el que las diferencias son menores.

La diferencia entre los valores del extremo y del centro es mayor cuanto mayor es la intensidad empleada. El abanico que se genera entre las curvas de extremo y centro tiene una apertura mayor desde el principio en el caso del LED azul, por lo que se puede deducir que la luz emitida por el LED azul tiene menor capacidad de penetración que la roja. Cuando se emplean los dos LEDs conjuntamente se

observa un comportamiento intermedio, como era de esperar, y se alcanzan los valores más altos. En el extremo del cono el valor de la PAR de la combinación de luces es superior a la suma de los valores de cada luz medida independientemente. Pero, cuando la evaluación de la PAR se hace en el centro el valor obtenido con la luz mixta es inferior a la suma de las individuales.

La evaluación de la lámpara fluorescente tubular mostró valores mucho menores de PAR a los obtenidos en la de los LEDs. Cuando se situó el sensor en el exterior del cono se obtuvieron valores que oscilaron entre 60 y 64 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y al situarlo en el centro la PAR disminuyó a valores que oscilaron entre 27 y 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Por tanto, prácticamente el valor de la PAR se reduce a la mitad al atravesar la luz desde el extremo hasta el centro del cono.

En comparación con el epígrafe 3.9.1, se ve qué los valores de la PAR medidos cerca de la fuente no se corresponden realmente con los valores que se pueden dar en el interior del cono. Ya que sí en el caso de la máxima intensidad obtendríamos un valor de 370 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a 60 mm de distancia, cuándo la medida se hace en el interior del cono se ve que este valor se reduce a 123 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ al atravesar el medio de cultivo. Por este motivo es importante explicar dónde se ha hecho la medida al dar valores de PAR.

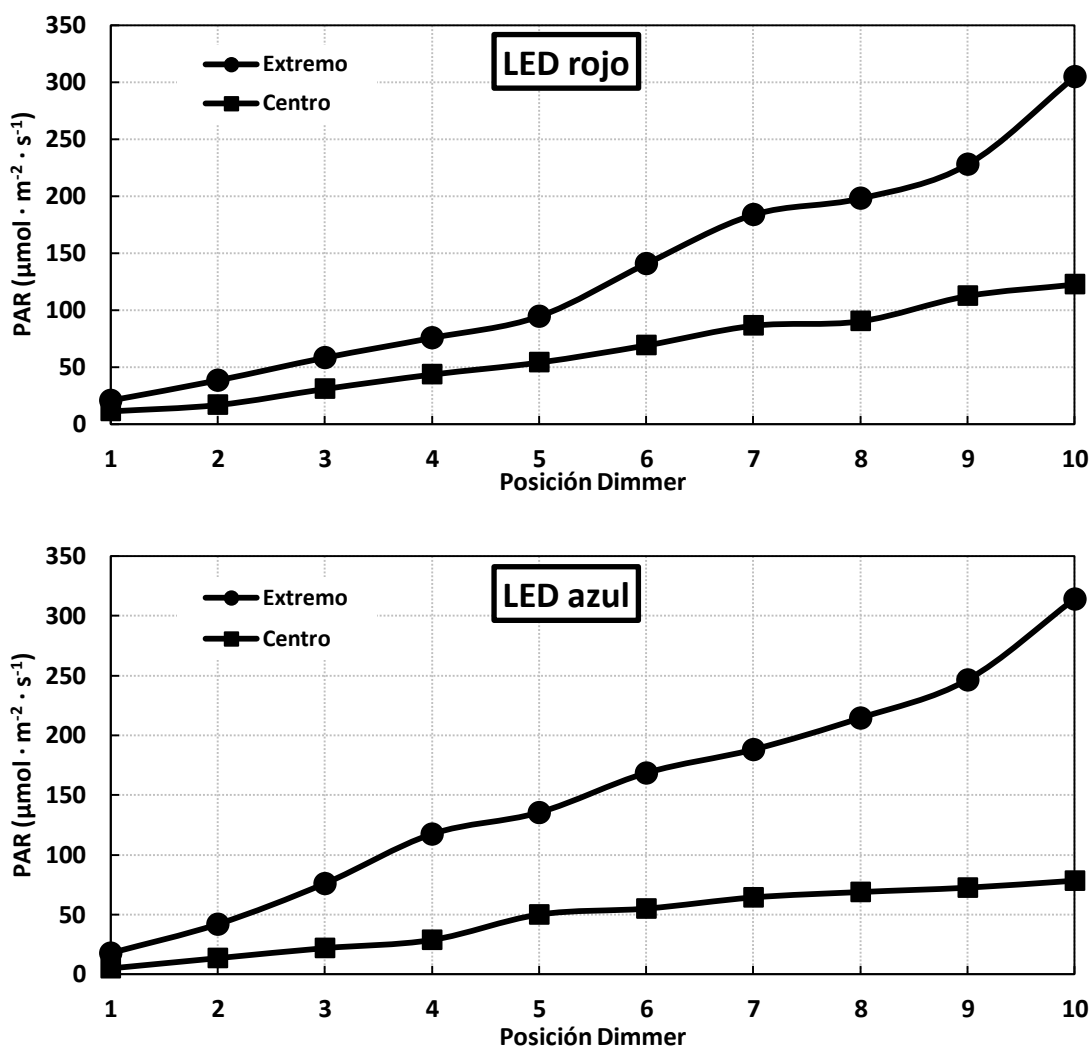


Fig. 66. Diferencias entre la medida de la PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) en el extremo y el centro del cono para el caso de los LEDs (*Light Emitting Diodes*) rojo y azul, en función de la intensidad de iluminación, regulada por la posición del *dimmer*.

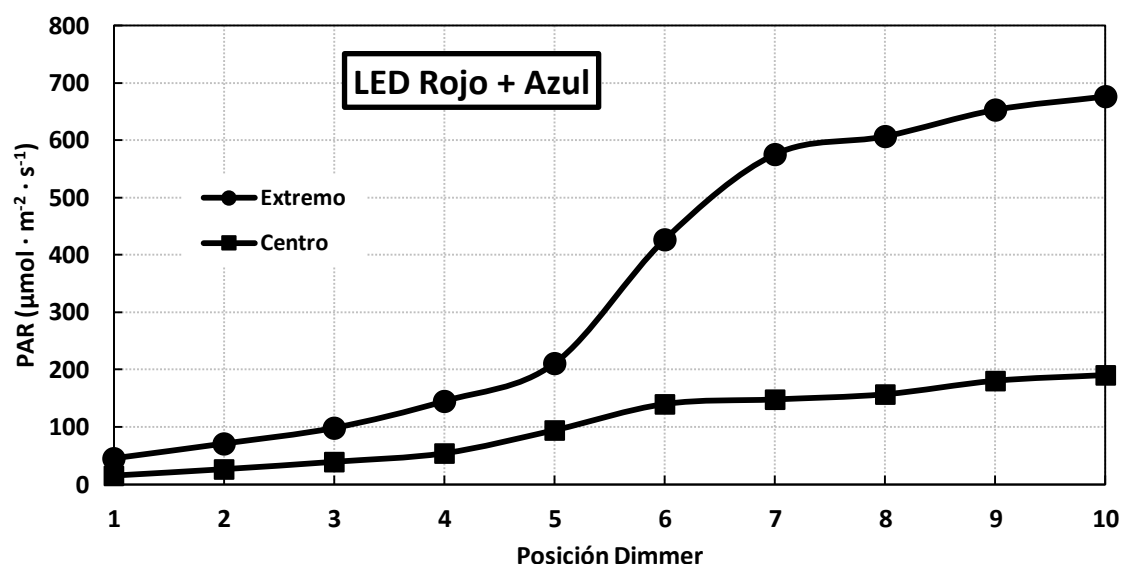


Fig. 67. Diferencias entre la medida de la PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) en el extremo y el centro del cono para el caso de la iluminación con mezcla de LEDs (*Light Emitting Diode*), en función de la intensidad de iluminación, regulada por la posición del *dimmer*.

3.9.3. EVALUACIÓN DE LA PAR EN FUNCIÓN DE LA POSICIÓN DENTRO DEL CONO Y LA DISTANCIA AL FOCO CON UN SENSOR ESFÉRICO SUMERGIBLE.

Para la realización de esta experiencia se empleó un sensor (Fig. 68) de PAR esférico sumergible (LI-193SA, Li-Cor). El sensor se situó en dos posiciones diferentes (Fig. 69), una en la parte inferior del cono y otra en la superior. La posición inferior tiene una altura de 23 cm. El diámetro del cono a esta altura y el del sensor son similares. De este modo el recorrido de la luz a través del medio en el cono es mínimo. La posición superior se estableció a 34 cm de altura. A esta altura el recorrido de la luz a través del medio es mayor. Para la realización de las medidas se empleó la pértiga usada en las anteriores experiencias, fijando el sensor al vástago por medio de bridas.



Fig. 68. Sensor de PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) esférico y sumergible (LI-193SA, Li-Cor) empleado en la experiencia. Se presenta acoplado al *Data-Logger* (LI-250, Li-Cor) usado para la lectura.

Al evaluar la evolución del PAR en la posición superior (Fig. 70), para las distintas intensidades posibles, observamos cómo los valores de la curva "Rojo + Azul" se corresponden en gran medida con la suma de los valores de cada color por separado. Ocurre lo mismo si se evalúan los valores de la posición inferior (Fig. 71).

El diámetro del sensor esférico es 6,1 cm y en la posición superior el diámetro del cono es de 9,4 cm por lo que el recorrido que debe hacer la luz a través del medio es de 1,65 cm, desde el extremo hasta el centro del cono. En este corto recorrido la atenuación que sufre la luz es muy elevada. En la posición inferior se alcanzan valores máximos de algo más de 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para la combinación de los dos LEDs, y en la superior el valor máximo que se alcanza al atravesar el medio es de casi 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Por lo que se produce una atenuación en los valores máximos de casi el 40 %.

La atenuación media para el color rojo es del 40,7 % (Tabla 6) con un máximo de 43,8 % y un mínimo del 34,8 %. La luz azul muestra valores mayores de atenuación con un promedio de 49,8 % (máximo de 52,1 % y mínimo de 46,8 %) y la luz mezcla presenta valores intermedios: promedio 45,8 %, 55 % y 42,2 % de máximo y mínimo respectivamente. Se produce una atenuación de la PAR de prácticamente la mitad en un recorrido de solo 1,65 cm.

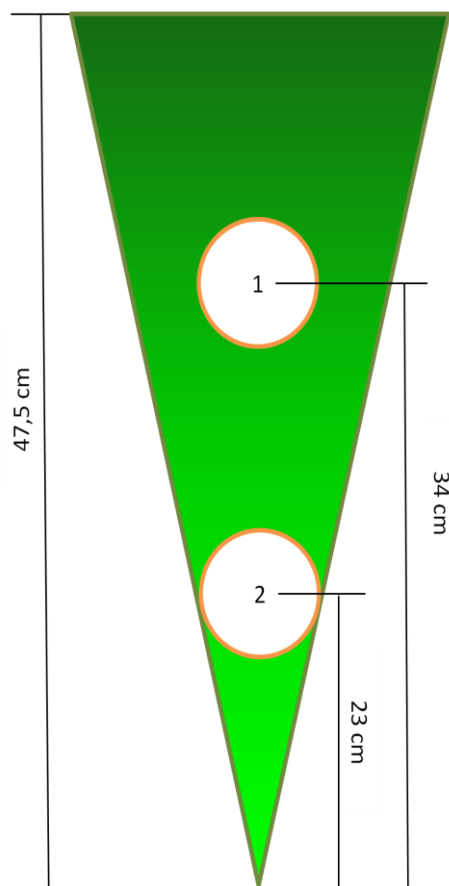


Fig. 69. Representación esquemática del cono y de las posiciones (1 y 2) del sensor de PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) esférico y sumergido.

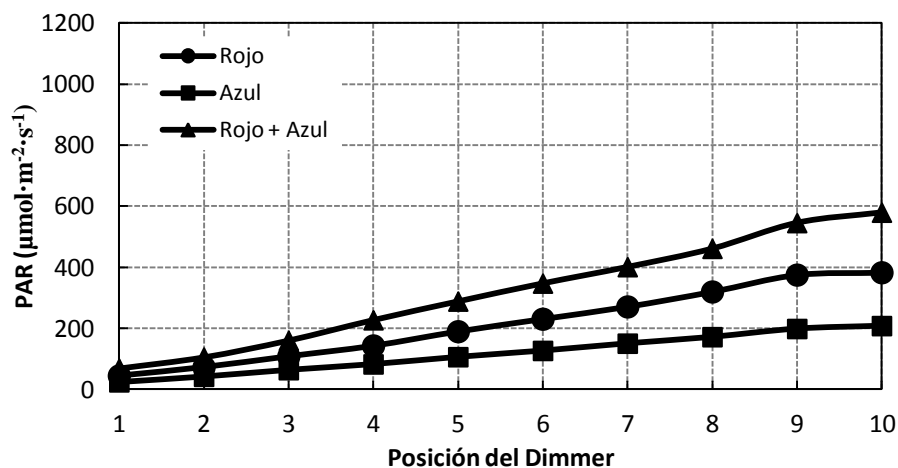


Fig. 70. Evolución de los valores de PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) en la parte superior del cono, dónde la luz tiene que recorrer 1,65 cm a través del medio de cultivo.

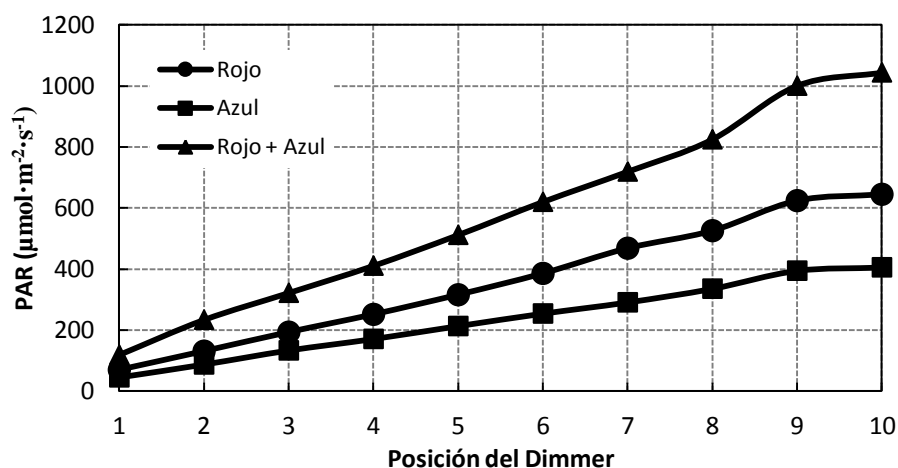


Fig. 71. Evolución de los valores de PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) en la parte inferior del cono. En esta posición el diámetro del cono y el del sensor son muy similares por lo que la luz prácticamente no tiene que atravesar el medio de cultivo.

Por otro lado se evaluó la PAR obtenida cuando se emplean las lámparas fluorescentes tubulares. Cuando el sensor de PAR esférico se situó en la parte inferior del cono se alcanzaron valores de PAR de $120,25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y al situarlo en la parte superior estos valores disminuyeron hasta los $69,27 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Los valores obtenidos con el sensor esférico son prácticamente el doble de los obtenidos con el plano ya que con este último sólo se tenía en cuenta una de las dos caras dónde estaban situadas estas lámparas. Aún así la PAR que otorgan las lámparas fluorescentes tubulares es mucho menor de la que se obtiene con los LEDs.

Al contrario de lo que se supuso en la primera conclusión del apartado 3.9.2, la luz mezcla presenta valores de PAR muy similares a la suma de los valores de PAR de cada luz por separado. Las diferencias entre la suma de los individuales y el valor de la mezcla difieren en menos del 5 %.

Tabla 6. Valores de la PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) medidos en la posición inferior del cono (se corresponde con la columna "Extremo") y en la superior ("Centro") y evaluación del porcentaje de atenuación de los mismos para los tres casos de iluminación empleada.

LED Rojo			
Posición del Dimmer	PAR ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)		Δ (%)
	Extremo	Centro	
1	69,2	45,1	34,8
2	130,5	73,3	43,8
3	192,8	108,6	43,7
4	251	143,1	43,0
5	315,3	189,8	39,8
6	385,2	230,6	40,1
7	467,7	270,9	42,1
8	525,1	319,8	39,1
9	623,5	375,1	39,8
10	644,3	382,8	40,6
Promedio			40,7
Valor Máximo			43,8
Valor Mínimo			34,8

LED Azul			
Posición del Dimmer	PAR ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)		Δ (%)
	Extremo	Centro	
1	44,85	23,88	46,8
2	87,06	41,96	51,8
3	133,1	63,71	52,1
4	170,7	82,57	51,6
5	212,9	106,24	50,1
6	253,9	126,82	50,1
7	290,6	150,49	48,2
8	335,2	171,75	48,8
9	394,2	198,62	49,6
10	405,2	208,1	48,6
Promedio			49,8
Valor Máximo			52,1
Valor Mínimo			46,8

LED Rojo +Azul			
Posición del Dimmer	PAR ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)		Δ (%)
	Extremo	Centro	
1	118,95	68,7	42,2
2	233,6	105,2	55,0
3	321,8	160,1	50,2
4	410,7	227,1	44,7
5	511,6	288,4	43,6
6	619,9	347,3	44,0
7	719	401,2	44,2
8	824,6	461,1	44,1
9	1000,2	545,5	45,5
10	1043,7	579,6	44,5
Promedio			45,8
Valor Máximo			55,0
Valor Mínimo			42,2

3.9.4. EVALUACIÓN DE LA PAR EN FUNCIÓN DE LA DENSIDAD ÓPTICA DEL CULTIVO Y DEL DIÁMETRO DEL RECIPIENTE, PARA DISTINTOS NIVELES DE INTENSIDAD DE LOS LEDs.

Para evaluar distintas densidades ópticas se partió de un medio concentrado y se fue diluyendo progresivamente. La concentración inicial fue de 0,65 unidades de absorbancia y se diluyó con agua destilada en 6 ocasiones hasta alcanzar 0,22 unidades de absorbancia (Tabla 7). En esta experiencia se empleó un recipiente de 150 mm de diámetro (Fig. 72). Debido a que el cono de cultivo que se empleó en el ensayo presenta diámetros distintos se decidió hacer otra evaluación en un recipiente de diámetro menor con el fin de discernir cómo afecta el recorrido de la luz a través del medio a la PAR obtenida. Por ello, para la siguiente experiencia se empleó un recipiente de diámetro 90 mm. La densidad óptica inicial fue de 0,58 y se diluyó en dos ocasiones hasta 0,37 unidades de absorbancia. Solo se evaluaron las tres densidades ópticas más representativas que fueron elegidas por ser el rango de valores de densidad óptica más frecuente en el ensayo (Tabla 7).

Tabla 7. Diferentes densidades ópticas evaluadas en esta experiencia. Se emplearon dos recipientes de diámetro distinto (150 y 90 mm). En el primero se evaluaron siete densidades ópticas y en el segundo solo las tres más representativas para el ensayo.

	Densidad óptica evaluada en los dos recipientes	
	150 mm	90 mm
1	0,647	
2	0,585	0,581
3	0,475	0,497
4	0,384	0,375
5	0,335	
6	0,264	
7	0,220	

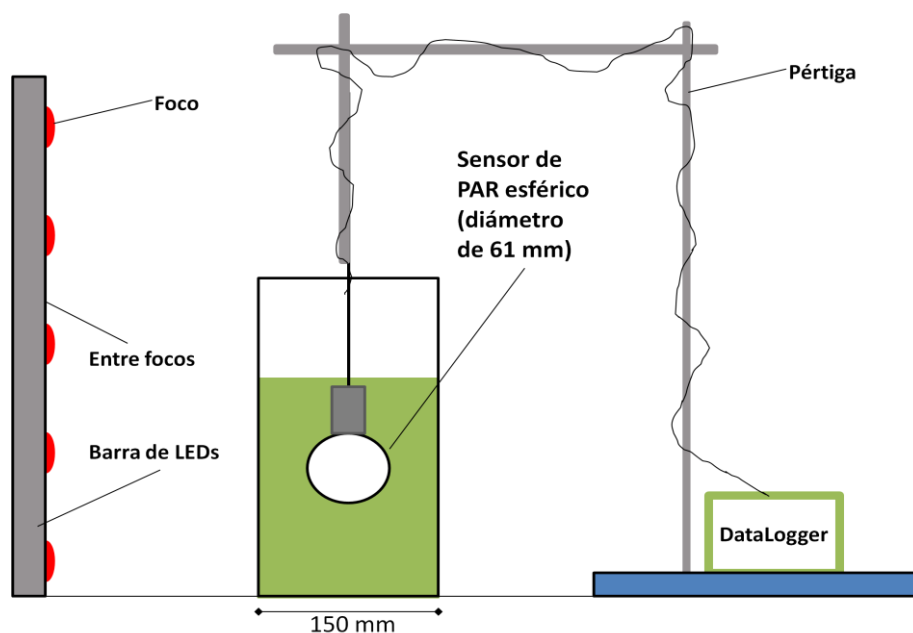


Fig. 72. Representación esquemática del sistema empleado para la realización de las medidas de PAR (Photosynthetically Active Radiation) con el sensor esférico. Se emplearon dos diámetros distintos (150 y 90 mm).

Los resultados obtenidos muestran como la reducción de los valores de densidad óptica del medio hace aumentar la PAR (Fig. 73). Se observa sin embargo que el aumento de la PAR no es igual en todos los casos. Al igual que en las situaciones anteriores los valores obtenidos dependen de la luz empleada. Así se observó de nuevo cómo la luz azul es la que mayor atenuación sufre al atravesar el medio y la roja la que menos, presentando un valor intermedio la experiencia con las ambas luces.

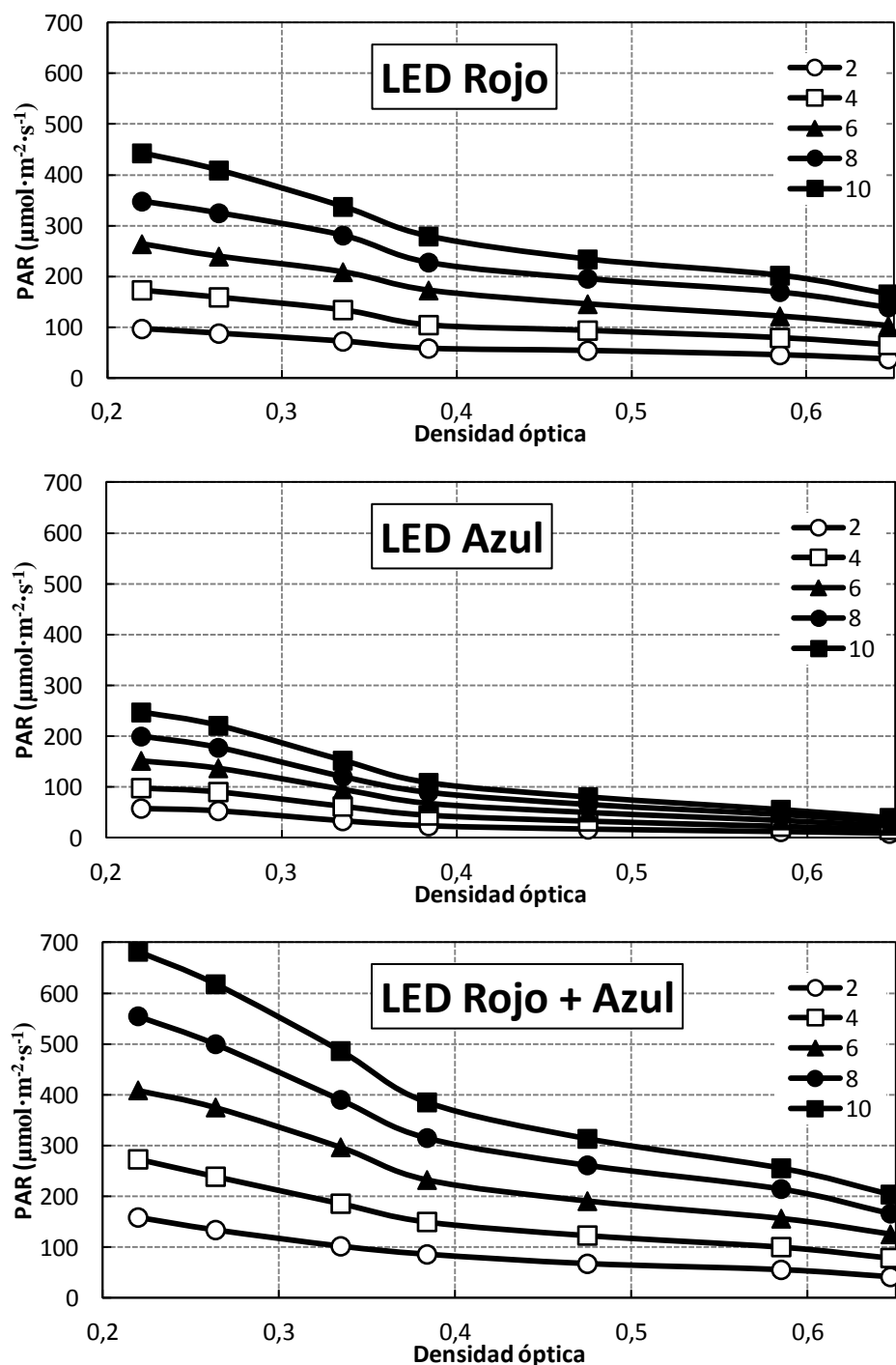


Fig. 73. Evaluación de la PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) en función de la densidad óptica para varios niveles de intensidad (expresados en función de la posición del *dimmer*). Se realizó la evaluación en un recipiente de 150 mm de diámetro. Se observa cómo se va reduciendo el valor de la PAR al aumentar la densidad óptica del medio de cultivo.

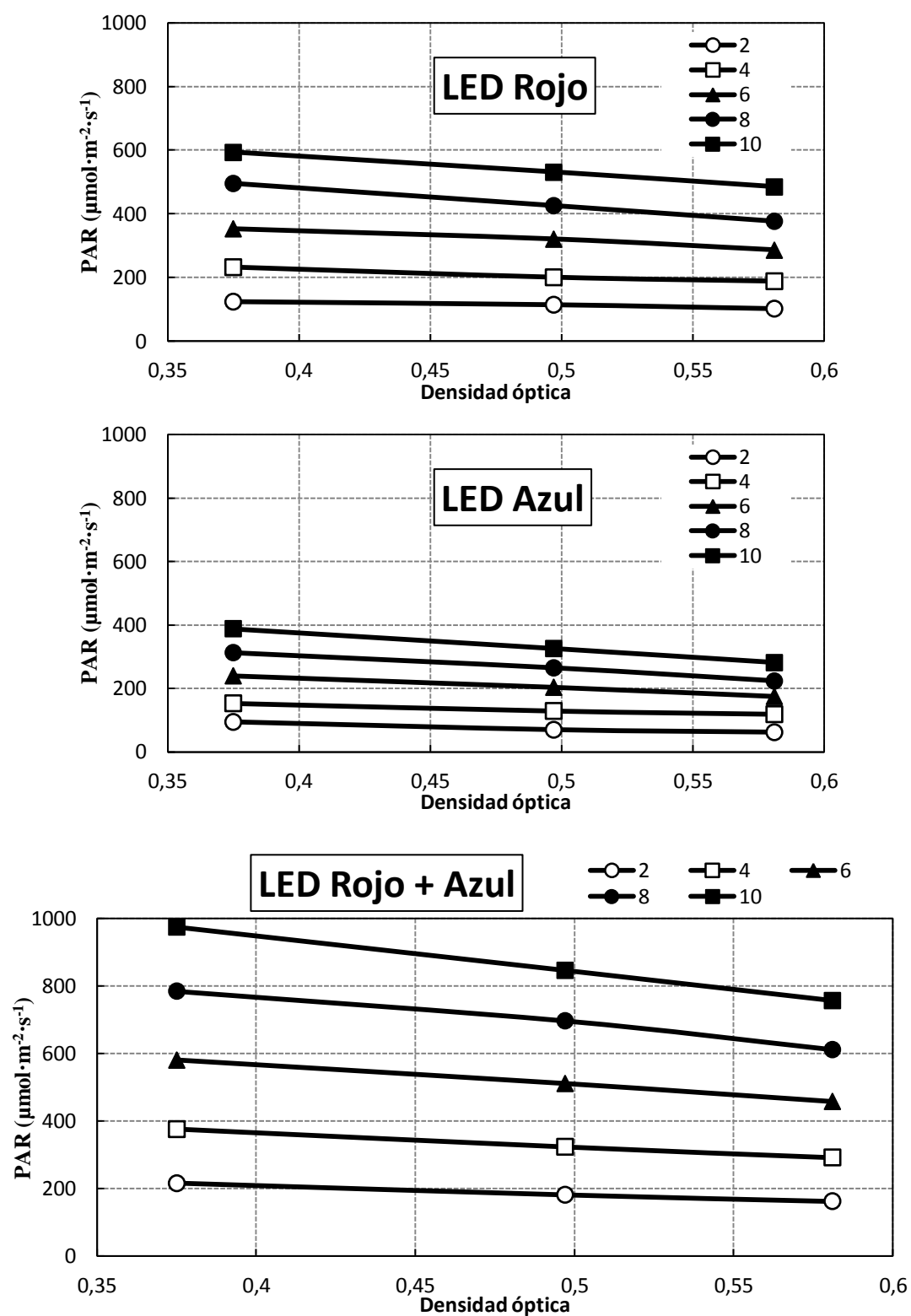


Fig. 74. Evaluación de la PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) en función de la densidad óptica para varios niveles de intensidad (expresados en función de la posición del *dimmer*). Se realizó la evaluación en un recipiente de 90 mm de diámetro. En este caso se tomaron solo tres densidades ópticas representativas; a ello se debe el carácter lineal de las curvas representadas.

En la evaluación con el recipiente de 150 mm se observan curvas con carácter descendente según aumenta la densidad óptica. Estas curvas presentan dos zonas claramente diferenciadas en las que la pendiente de descenso es distinta (Fig. 73). La primera zona se corresponde con los valores de densidad óptica situados entre 0,220 y 0,384 unidades de absorbancia; y la segunda se encuentra entre los valores 0,384 y 0,647 de densidad óptica. En la primera zona la pendiente es mucho más acusada que en la segunda. Este fenómeno depende también de la intensidad de la luz incidente y del color de la misma, siendo más evidente en el caso de la aplicación de ambas luces.

La densidad óptica al inicio del cultivo durante las semanas de ensayo se encontraba en valores cercanos a 0,2 unidades de absorbancia. En este punto el medio de cultivo era prácticamente transparente, por ello es lógico que sea en este punto dónde los valores de PAR sean mayores. El paso de 0,2 a 0,4 unidades de absorbancia tenía lugar en el plazo de 48 horas y suponía el cambio más radical en el medio de cultivo, ya que de ser prácticamente transparente pasaba a ser totalmente verde. Es por ello que la pendiente entre estos puntos es más acusada ya que una vez alcanzada la totalidad verde los cambios en la intensidad del mismo se producían más lenta y sutilmente. De esta manera se explica que haya dos pendientes diferentes en la curva.

En el caso de la evaluación en el recipiente de 90 mm (Fig. 74) se observan simplemente rectas de carácter ligeramente descendente. Esto se debe a que solo se evaluaron tres densidades ópticas y a que éstas se encontraban dentro del rango descrito anteriormente en el que la pendiente de descenso es menor.

Por otro lado al ser un recipiente de diámetro menor se aprecia cómo los valores son muy superiores al caso anterior, aunque presenten una tendencia similar. Para cuantificar esta diferencia se compararon los resultados obtenidos en ambos recipientes para valores de densidad óptica similar. Se elaboró una gráfica de dispersión (Fig. 75) para esas tres densidades ópticas similares y se extrajo una recta de regresión para cada diámetro de recipiente estudiado (90 y 150 mm). De este modo se puede conocer mejor cómo afecta en la PAR la distancia a recorrer por la luz en el medio.

Tabla 8. Valores de densidad óptica evaluados para la comparación entre los recipientes de distinto diámetro.

Valores de densidad óptica evaluados	
150 mm	90 mm
0,585	0,581
0,475	0,497
0,384	0,375

A partir de las rectas de regresión se obtuvieron valores indicativos en función de la intensidad (expresada en función de la posición del *dimmer*) para cada recipiente y cada luz distinta (Tabla 9). De este modo se pudo comprobar de nuevo que la luz roja sufre menos atenuación al atravesar el medio que la luz azul, y que al emplear los dos colores a la vez se obtienen valores intermedios.

El diámetro de estos recipientes es mayor que el de los conos empleados en el ensayo lo que permitió evaluar cómo se comporta la luz al atravesar una longitud mayor en el medio de cultivo. El diámetro de la esfera del sensor es de 61 mm por lo que en el caso del recipiente de 90 mm la luz debe atravesar 14,5 mm de medio de cultivo y 44,5 mm en el recipiente de 150 mm. Hay una diferencia de 30 mm entre ambos recipientes que provoca una reducción de la PAR entre el 55% y el 76% para el caso del rojo y el azul respectivamente, y del 63% con ambas luces (Tabla 9).

Los datos obtenidos en el recipiente de 150 mm de diámetro se pueden sumar a los obtenidos en la evaluación anterior con el sensor esférico en el cono (603.9.3) porque la densidad óptica del medio fue la misma, con el fin de evaluar mejor la atenuación de la luz en el medio de cultivo. De este modo se tienen tres puntos por los que pasa la luz: el extremo del cono (dónde no influye el medio de cultivo), a 16,5 mm y a 44,5 mm del extremo. En los primeros 16,5 mm la PAR se reduce entre un 41 y un 50% (depende del LED) y en los siguientes 30 mm hasta alcanzar los 44,5 mm se produce una reducción de entre el 74% y el 90% (Tabla 10).

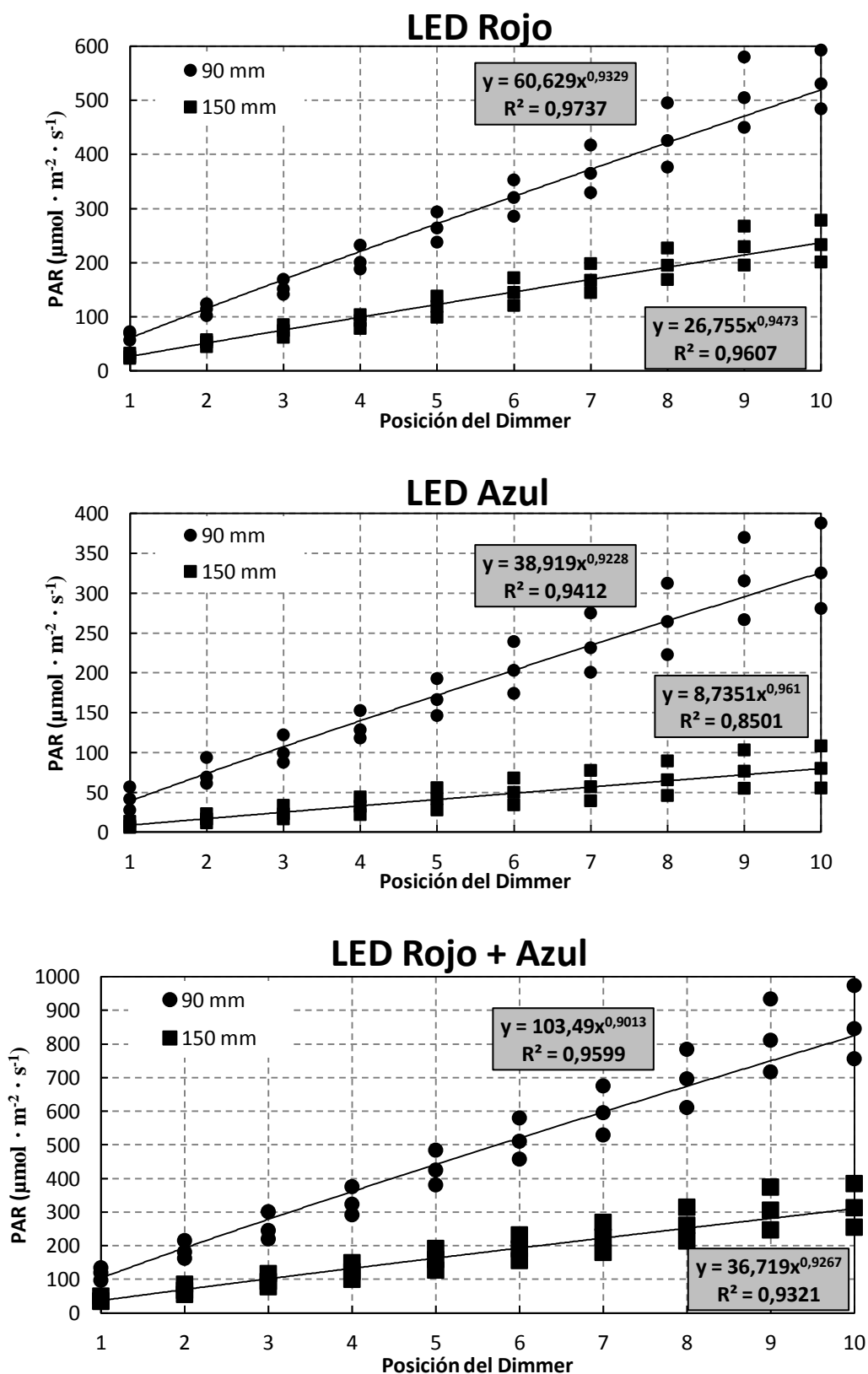


Fig. 75. Gráfica de dispersión y recta de regresión obtenidas en la evaluación del PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) en función de la intensidad (determinada por la posición del *dimmer*) y de los diferentes LEDs (*Light Emitting Diodes*). A partir de los valores obtenidos en la evaluación de las tres densidades ópticas se obtuvieron estas rectas de regresión para los recipientes de 90 y 150 mm de diámetro respectivamente.

Tabla 9. Valores obtenidos al variar la intensidad en cada una de las ecuaciones extraídas de las rectas de regresión para los dos recipientes y las distintas luces. Se observa cómo la luz roja presenta una atenuación menor que la azul a su paso por el medio de cultivo.

Posición del <i>dimmer</i>	PAR LED Rojo			PAR LED Azul			PAR LED Rojo + Azul		
	90 mm	150 mm	Δ (%)	90 mm	150 mm	Δ (%)	90 mm	150 mm	Δ (%)
1	60,63	26,76	55,87	38,92	8,74	77,56	103,49	36,72	64,52
2	115,75	51,59	55,43	73,78	17,00	76,95	193,29	69,80	63,89
3	168,96	75,75	55,17	107,26	25,11	76,59	278,57	101,63	63,52
4	220,97	99,48	54,98	139,88	33,10	76,34	361,02	132,68	63,25
5	272,11	122,90	54,84	171,86	41,02	76,13	441,45	163,16	63,04
6	322,57	146,07	54,72	203,35	48,87	75,97	520,29	193,20	62,87
7	372,45	169,03	54,62	234,43	56,68	75,82	597,84	222,87	62,72
8	421,86	191,82	54,53	265,18	64,44	75,70	674,30	252,22	62,59
9	470,86	214,47	54,45	295,62	72,16	75,59	749,82	281,31	62,48
10	519,49	236,98	54,38	325,81	79,85	75,49	824,51	310,16	62,38
	Promedio:		54,90	Promedio:		76,21	Promedio:		63,13
	Máximo:		55,87	Máximo:		77,56	Máximo:		64,52
	Mínimo:		54,38	Mínimo:		75,49	Mínimo:		62,38

Tabla 10. Estudio de la atenuación del PAR al atravesar el medio de cultivo. Elaborado a partir de los datos obtenidos en el apartado 3.9.3 y 3.9.4.

Posición <i>Dimmer</i>	LED Rojo						LED Azul						LED Rojo + Azul					
	PAR ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)			Reducción PAR (%)			PAR ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)			Reducción PAR (%)			PAR ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)			Reducción PAR (%)		
	0 ¹	1,65 ²	4,45 ³	0	1,65	4,45	0	1,65	4,45	0	1,65	4,45	0	1,65	4,45	0	1,65	4,45
1	69,2	45,1	15,52	100	65,17	22,43	44,85	23,88	5,14	100	53,24	11,46	118,95	68,7	23,72	100	57,76	19,94
2	130,5	73,3	37,39	100	56,17	28,65	87,06	41,96	8,72	100	48,20	10,02	233,6	105,2	41,52	100	45,03	17,77
3	192,8	108,6	51,48	100	56,33	26,70	133,1	63,71	12,79	100	47,87	9,61	321,8	160,1	59,37	100	49,75	18,45
4	251	143,1	65,33	100	57,01	26,03	170,7	82,57	16,27	100	48,37	9,53	410,7	227,1	78,94	100	55,30	19,22
5	315,3	189,8	84,15	100	60,20	26,69	212,9	106,24	20,28	100	49,90	9,53	511,6	288,4	102,18	100	56,37	19,97
6	385,2	230,6	103,19	100	59,87	26,79	253,9	126,82	24,24	100	49,95	9,55	619,9	347,3	125,53	100	56,03	20,25
7	467,7	270,9	121,65	100	57,92	26,01	290,6	150,49	28,01	100	51,79	9,64	719	401,2	145,64	100	55,80	20,26
8	525,1	319,8	139,25	100	60,90	26,52	335,2	171,75	32,76	100	51,24	9,77	824,6	461,1	166,23	100	55,92	20,16
9	623,5	375,1	159,4	100	60,16	25,57	394,2	198,62	39,55	100	50,39	10,03	1000,2	545,5	195,25	100	54,54	19,52
10	644,3	382,8	165,1	100	59,41	25,62	405,2	208,1	39,75	100	51,36	9,81	1043,7	579,6	203,8	100	55,53	19,53
	Promedio (%)			100	59,31	26,10	Promedio (%)			100	50,23	9,89	Promedio (%)			100	54,20	19,51
	Diferencia con el extremo (%)				40,69	73,90	Diferencia con el extremo (%)				49,77	90,11	Diferencia con el extremo (%)				45,80	80,49

¹. Se corresponde con los datos obtenidos en la evaluación del PAR en el extremo del cono en el apartado 3.9.3.

². Se corresponde con los datos obtenidos en la evaluación del PAR en el centro del cono en el apartado 3.9.3.

³. Se corresponde con los datos obtenidos en la evaluación del PAR en el apartado 3.9.4 en el caso del recipiente de 150 mm de diámetro para la máxima densidad óptica (0,647 unidades de absorbancia). Este valor de densidad óptica fue el mismo en los tres casos, es por ello que se pueden comparar.

4.CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos y de la discusión de los mismos se puede concluir que:

1. Es posible cultivar microalgas empleando únicamente luz azul y/o roja proveniente de LEDs (*Light Emitting Diodes*).
2. No se observan diferencias significativas entre la producción con LEDs y la producción con fluorescentes. Se obtienen prácticamente los mismos resultados en todas las experiencias salvo en el caso de aplicar luz roja y luz azul, ambas al 50 % de intensidad. En este caso la producción con LEDs es un 30 % superior a la obtenida en el testigo (fluorescente).
3. Los LEDs no son una fuente de calor adicional para el cultivo como si lo suelen ser las lámparas incandescentes. Los fluorescentes a pesar de tener una baja emisión en la zona calorífica aportan calor al cultivo. Alrededor de cuatro grados Celsius de diferencia entre los fluorescentes y los LEDs.
4. Es necesario la formulación de un medio que tenga capacidad tamponante o la adición de CO₂ porque de lo contrario el valor del pH alcanza valores superiores a 10.
5. Según lo observado en la cuarta y quinta experiencia es conveniente no mantener ningún cultivo por más de cuatro semanas, ya que es fácil que en este periodo alcance la fase de senectud.
6. La Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR, del inglés *Photosynthetically Active Radiation*) medida directamente en el foco da como resultado valores altísimos que se reducen enormemente en distancias muy cortas. Pasando de 8310 a 370 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ en solo 6 cm. La distancia al foco determinará en gran medida la PAR que se obtiene en el cultivo.
7. La luz roja (660 nm) presenta siempre valores de PAR superiores a la luz azul (450 nm). Siendo la combinación de ambas radiaciones la situación que presenta valores mayores. La suma de los valores independientes de ambos LEDs coincide prácticamente con el valor obtenido al emplear las dos luces juntas.
8. La luz producida por las lámparas fluorescentes tubulares presenta una PAR mucho menor que la de los LEDs. Se obtuvieron valores de 270 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ enfrentando el sensor directamente al foco y cuando se hizo la medida en la parte exterior e interior del cono con medio de cultivo los valores fueron de 120 y 69 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente.
9. La luz roja presenta una atenuación menor que la luz azul en su paso a través del medio. La luz sufre una atenuación del 40 % al 50 % al atravesar 1,65 cm de medio con una densidad óptica de 0,65 unidades de absorbancia. Cuando la distancia a recorrer se aumenta a 4,45 cm la atenuación se reduce entre un 74 % y un 90 %.
10. Los valores de PAR disminuyen al aumentar la densidad óptica del medio de cultivo. La pendiente de disminución es más acusada cuando los valores de densidad óptica se encuentran entre 0,2 y 0,4 unidades de absorbancia. La pendiente decreciente de PAR es menor para valores situados entre 0,4 y 0,6 unidades de absorbancia.

5. BIBLIOGRAFÍA

Abalde, J. y otros, 1995. *Microalgas: Cultivo y aplicaciones*. A Coruña: Universidade da Coruña - Servicio de Publicaciones.

Arthur D. Little, Inc., 1953. Pilot-Plant studies in the production of Chlorella. En: J. Burlew, ed. *Algal Culture: from laboratory to pilot plant*. Washington: Carnegie Institution of Washington, pp. 235-272.

Azcón-Bieto, J. & Talón, M., 2008. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Segunda Edición ed. Barcelona: McGRAW-HILL.

Barceló-Coll, J., Nicolás Rodrigo, G., Sabater García, B. & Sánchez Tamés, R., 2001. *Fisiología vegetal*. Madrid: Pirámide.

Barceló-Coll, J., Nicolás Rodrigo, G., Sabater García, B. & Sánchez Tamés, R., 2001. *Fisiología vegetal*. Madrid: Pirámide.

Beijerinck, M., 1890. Cultuversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen.. *Botanische Zeitung*, Issue 48, pp. 726-740.

Benemann, J. R., 2008. Opportunities and challenges in algal biofuels production. Singapore: AlgaeWorld-FAO.

BioPlat, 2010. *Energía de las algas: presente y futuro*. s.l.:BioPlat - Plataforma Tecnológica Española de la Biomasa.

Borowitzka, M. A., 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, Issue 9, pp. 393-401.

Brown, M., Jeffrey, S., Volkman, J. & Dunstan, G., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, Issue 151, pp. 315-331.

Burlew, J., 1953. *Algal Culture: from laboratory to pilot plant*. Washington: Carnegie Institution of Washington.

Carvalho, A. P., Silva, S. O., Baptista, J. M. & Malcata, F. X., 2011. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects.. *Applied Microbiology Biotechnology*, Issue 89, pp. 1275-1288.

Chen, C.-Y. y otros, 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review.. *Bioresource Technology*, Issue 102, pp. 71-81.

Coutteau, P., 1996. Microalgae. En: P. Lavens & P. Sorgeloos, edits. FAO Fisheries Technical Paper No. 361. Manual on the production and use of live food for aquaculture.. Roma: FAO, p. 295.

Cuaresma, M., Janssen, M., Vilchez, C. & Wijffels, R. H., 2011. Horizontal or vertical photobioreactors? How to improve microalgae photosynthetic efficiency. *Bioresource Technology*, Issue 102, pp. 5129-5137.

Das, P., Lei, W., Aziz, S. S. & Obbard, J. P., 2011. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light.. *Bioresource Technology*, Issue 102, pp. 3883-3887.

De la Rosa, M. A., Hervás, M., Serrano, A. & Losada, M., 1990. *Fotobioquímica*. Madrid: Síntesis.

De la Rosa, M., Hervás, M., Serrano, A. & Losada, M., 1990. *Fotobioquímica*. Madrid: Síntesis.

Durán, J. M., 2011. *FONTES RENOVÁVEIS DE ENERGIA - Cultivo de microalgas para biodiésel*. [Obra de arte] (Universidade Federal de Viçosa-MG).

Eriksen, N. T., 2008. The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, Issue 30, pp. 1525-1536.

Evenari, M., Mayer, A. & Gottesman, E., 1953. Experiments on Culture of Algae in Israel. En: J. Burlew, ed. *Algal Culture: from laboratory to pilot plant*. Washington: Carnegie Institution of Washington, pp. 197-203.

Fernández, J., 1982. *Fotosíntesis como fuente de energía*. Madrid: ASINEL - Programa de investigación de UNESA.

Fernández, J., 2011. Fotobiorreactor laminar de tipo biofilm (B-PBRL) patentado por la UPM. España, Patente nº ES 2 347 515 B2.

Fisher Jr., A. W. & Burlew, J. S., 1953. Nutritional value of microscopic algae. En: J. Burlew, ed. *Algal Culture: from laboratory to pilot plant*. Washington: Carnegie Institution of Washington, pp. 303-310.

Fu, W. y otros, 2012. Maximizing biomass productivity and cells density of *Chlorella vulgaris* by using light-emitting diode-based photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, Issue 161, pp. 242-249.

García F., J. & Boix A., O., 1999. *Luminotecnia. Iluminación de interiores y exteriores.*, Barcelona: Departament d'Enginyeria Elèctrica. Secció de Barcelona. ETSEIB. UPC..

Golueke, C. G. & Oswald, W. J., 1959. Biological conversion of light energy to the chemical energy of methane. *Applied and Environmental Microbiology*, VII(4), pp. 219-227.

Gordon, J. M. & Polle, E. W. J., 2007. Ultrahigh bioproductivity from algae. *Applied Microbiology Biotechnology*, Issue 76, pp. 969-975.

Grobbelaar, J. U., 2009. Upper limits of photosynthetic productivity and problems of scaling.. *Journal of Applied Phycology*, Issue 21, pp. 519-522.

Grobbelaar, J. U., 2010. Microalgal biomass production: challenges and realities.. *Photosynthesis Research*, Issue 106, pp. 135-144.

Gummert, F., Meffert, M. & Stratmann, H., 1953. Non-esterile large-scale culture of *Chlorella* in greenhouse and open air.. En: J. Burlew, ed. *Algal Culture: from laboratory to pilot plant*. Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington, pp. 166-176.

Han, B.-P., Virtanen, M., Koponen, J. & Straskraba, M., 2000. Effect of photoinhibition on algal photosynthesis: a dynamic model. *Journal of Plankton Research*, 22(5), pp. 865-885.

Hao, Z. y otros, 2011. *Nostoc sphaeroides* Kützinger, an excellent candidate producer for CELSS. *Advances in Space Research*, Issue 48, pp. 1565-1571.

Harder, R. & Von Witsch, H., 1942. Über Massenkultur von diatomeen.. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, Issue 60, p. 142.

Harun, R., Singh, M., Forde, G. M. & Danquah, M. K., 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products.. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Issue 14, pp. 1037-1047.

- Hill, R., 1965. The Biochemist's green mansions: the photosynthetic electron chain in plants.. *Essays in Biochemistry*, Issue 1, pp. 121-151.
- Hu, Q., 2004. Environmental effects on cell composition. En: A. Richmond, ed. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science Ltd, pp. 84-93.
- Iwamoto, H., 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products - Major industrial species: *Chlorella*. En: A. Richmond, ed. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science Ltd., pp. 255-263.
- Kumar, K. & Das, D., 2012. Growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* in airlift and bubble column photobioreactors. *Bioresource Technology*, Issue 116, pp. 307-313.
- Kunjapur, A. M. & Eldridge, R. B., 2010. Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae.. *Ind. Eng. Chem. Res.*, Issue 49, pp. 3516-3526.
- Lee, C.-G. & Palsson, B. O., 1994. High-density algal photobioreactors using Light-Emitting Diodes. *Biotechnology and Bioengineering*, Volumen 44, pp. 1161-1167.
- Lee, C.-G. & Palsson, B. O., 1995. Light Emitting Diode-Based algal photobioreactor with external gas exchange. *Journal of fermentation and bioengineering*, 79(3), pp. 257-263.
- Masojídek, J., Koblizek, M. & Giuseppe, T., 2004. Photosynthesis in Microalgae. En: A. Richmond, ed. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Publishing, pp. 20 - 40.
- Masojídek, J. & Prášil, O., 2010. The development of microalgal biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Issue 37, pp. 1307-1317.
- Mata, T. M., Martins, A. A. & Caetano, N. S., 2010. Microalgae for biodiesel production and another applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Issue 14, pp. 217-232.
- Melis, A., 2009. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*, Issue 177, pp. 272-280.
- Milner, H. W., 1953. The chemical composition of algae. En: J. Burlew, ed. *Algal Culture: from laboratory to pilot plant*. Washington: Carnegie Institution of Washington, pp. 285-302.
- Mitsuya, A., Nyunoya, T. & Tamiya, H., 1953. Pre-Pilot-Plant experiments on algal mass culture. En: J. Burlew, ed. *Algal Culture: from laboratory to pilot plant*.. Washington: Carnegie Institution of Washington, pp. 273-284.
- Molina-Grima, E., 2008. *Photobioreactors engineering and scale-up*. [Obra de arte] (Departamento de Química, Universidad de Almería).
- Morita, M., Watanabe, Y. & Saiki, H., 2000. High photosynthetic productivity of green microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volumen 87, p. 203.
- Mortain-Bertrand, A., Descolas-Gros, C. & Jupin, H., 1987. Stimulating effect of light-to-dark transitions on carbon assimilation by a marine diatom.. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*., Issue 112, pp. 11-26.

- Morweiser, M., Kruse, O., Hankamer, B. & Posten, C., 2010. Developments and perspectives of photobiorreactors for biofuel production. *Applied Microbiology Biotechnology*, Issue 87, pp. 1291-1301.
- Navas, L. M., 2010. *Sistemas de control de fotobiorreactores para la producción de microalgas*. [Obra de arte] (GIR-TRADUS, Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias, Universidad de Valladolid.).
- Navas, L. M., 2012. Eficacia o Rendimiento Luminoso y Eficiencia luminosa. Madrid: s.n.
- Nickelsen, K., 2007. Otto Warburg's first approach to photosynthesis.. *Photosynthesis Research*, I(92), pp. 109-120.
- Oilgae, 2011. Comprehensive Oilgae Report. Energy from Algae: Products, Market, Processes & Strategies., Tamilnadu, India: s.n.
- Pulz, O., 2001. Photobiorreactors: production system for phototropic microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnology*, Issue 57, pp. 287-293.
- Pulz, O. & Scheibenbogen, K., 1998. Photobiorreactors: Design and performance with respect to light energy input. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, Volumen 59, pp. 123-152.
- Qiang, H., Zarmi, Y. & Richmond, A., 1998. Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *European Journal of Phycology*, Issue 33, pp. 165-171.
- Richmond, A. & Qiang, H., 1997. Principles for efficient utilization of light for mass production of photoautotrophic microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volumen 63-65, pp. 649-658.
- Rodríguez-López, M., 1964. Influence of the inoculum and the medium on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*.. *Nature*, pp. 203, 666..
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A., 2006. Commercial applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), pp. 87-96.
- Suali, E. & Sarbatly, R., 2012. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Issue 16, pp. 4316-4342.
- Suh, I. S. & Lee, C. G., 2003. Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(8), pp. 313-321.
- Tabernero, A., Martín del Valle, E. M. & Galán, M. A., 2011. Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: Scale-up and economics. *Biochemical Engineering Journal*, Issue 5414, p. 12.
- Tenessen, D. J., Singaas, E. L. & Sharkey, T. D., 1994. Light-emitting diodes as a light source for photosynthesis research. *Photosynthesis Research*, Issue 39, pp. 85-92.
- Tomaselli, L., 2004. The Microalgal cell. En: A. Richmond, ed. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science Ltd., pp. 3-19.
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H. & Uchiyama, H., 2007. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*. *Photosynthetica*, 2(45), pp. 309-311.

- Vonshak, A. & Torzillo, G., 2004. Environmental Stress Physiology. En: A. Richmond, ed. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science Ltd, pp. 57-82.
- Wang, C.-Y., Fu, C.-C. & Liu, Y.-C., 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal*, Issue 37, pp. 21-25.
- Weyer, K. M., Bush, D. R., Darzins, A. & Willson, B. D., 2010. Theoretical maximum algal oil production. *Bioenergetic Resource*, Issue 3, pp. 204-213.
- Whatley, J. M. & Whatley, F. R., 1983. *Cuadernos de biología. Luz y vida vegetal*. Barcelona: Omega.
- Xue, S., Su, Z. & Cong, W., 2011. Growth of *Spirulina platensis* enhanced under intermittent illumination. *Journal of Biotechnology*, Issue 151, pp. 271-277.
- Yeh, N. & Chung, J.-P., 2009. High-brightness LEDs - Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Issue 13, pp. 2175-2180.
- Zeng, X., Danquah, M. K., Chen, X. D. & Lu, Y., 2011. Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Issue 15, pp. 3252-3260.

ANEXOS

ANEXO I. EVALUACIÓN DE LOS ESPECTROS DE EMISIÓN DE DISTINTAS FUENTES DE LUZ.

Con el fin de conocer exactamente la cantidad y la calidad de la luz que se estaba aplicando al cultivo se llevaron a cabo una serie de experiencias para evaluar distintas fuentes de iluminación. Se evaluaron dos tipos de lámparas fluorescentes tubulares, una lámpara incandescente de cultivo y distintos tipos de LEDs, así como la luz solar. Se llevó a cabo la evaluación del espectro de emisión de las lámparas con un espectroradiómetro (LI-1800, Li-Cor).

I. 1. LUZ SOLAR.

Se tomaron muestras de luz solar incidente en un día despejado a las 15:00 h de la tarde, a mediados de febrero (Fig. I. 76). Es la fuente de luz más barata de todas las evaluadas, pero es la más complicada de controlar, ya que su suministro no es constante ni en forma ni en cantidad debido al ciclo día/noche y a las condiciones climáticas.

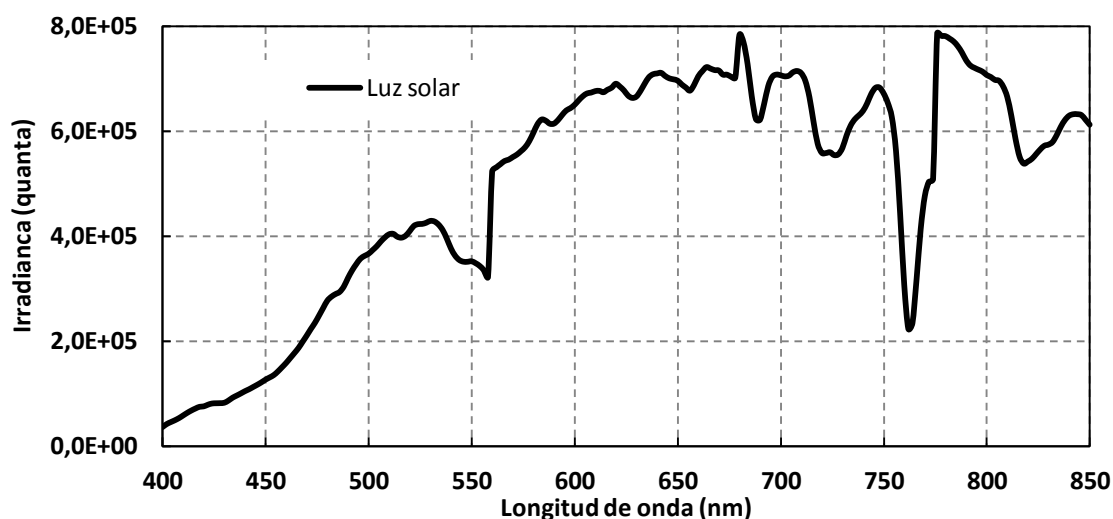


Fig. I. 76. Espectro de emisión de la luz solar a las 15:00 h de la tarde de un día despejado a mediados de febrero.

I. 2. LÁMPARA INCANDESCENTE.

La lámpara incandescente presenta la mayor intensidad de todas las fuentes de luz evaluadas. La mayor parte de la emisión se produce en la región térmica (superior a 750 nm), es por ello que estas lámparas generan una gran cantidad de calor (Fig. I. 77). Para evitar que este calor afecte al cultivo, o bien se alejan lo suficiente o bien es necesario incluir algún tipo de refrigeración. Estas lámparas son empleadas en cultivos en invernadero porque tienen un coste menor y su instalación es sencilla, pero tienen una eficiencia luminosa muy baja del orden del 2 % (Navas, 2012) y un consumo energético alto.

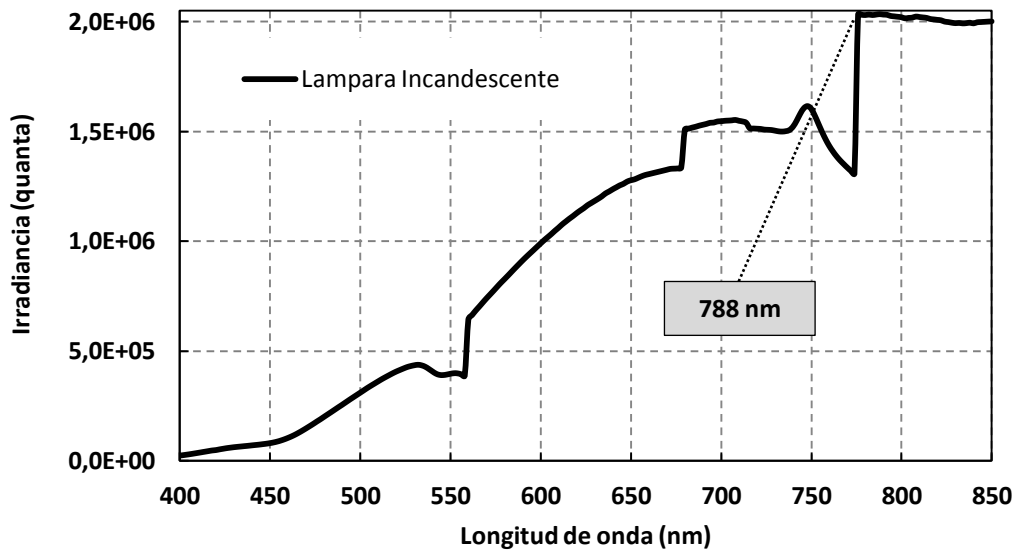


Fig. I. 77. Espectro de emisión de la lámpara incandescente. La mayor parte de la radiación se produce por encima de 750 nm, dónde solo se produce calor.

Si se compara el espectro de esta lámpara con la luz solar se ve que tiene unos valores muy superiores, sobre todo en la región calorífica. Es evidente que no son comparables debido a que todo depende de la distancia del equipo a la fuente, pero a pesar de las diferencias que presentan en magnitud, se puede observar que ambas tienen una tendencia similar. Presentan a grandes rasgos los mismos picos y caídas, siendo evidente la similitud en las caídas a 550 y 760 nm, junto con el pico cerca de 680 nm (Fig. I. 78).

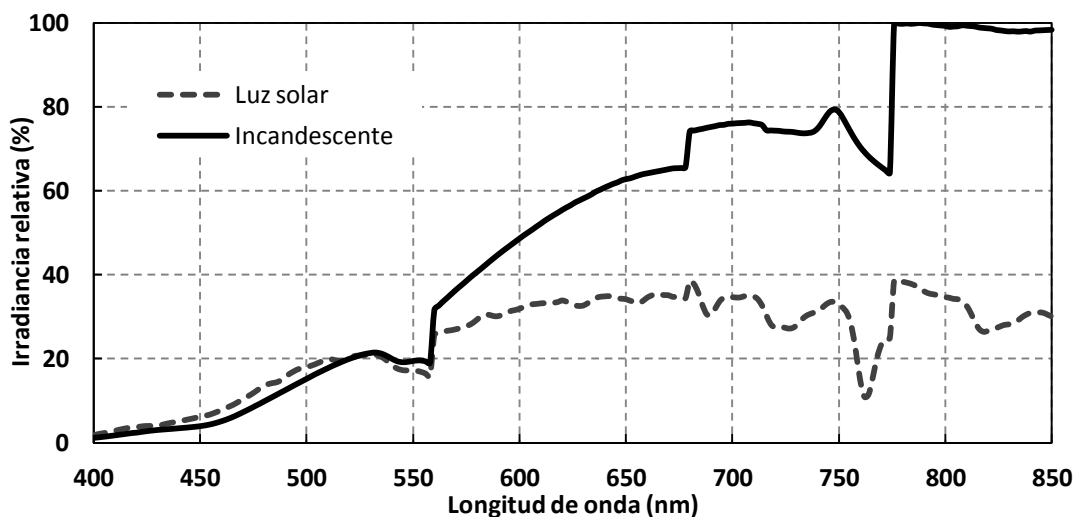


Fig. I. 78. Comparación de los espectros de luz solar y lámpara incandescente. El espectro de emisión de la lámpara incandescente muestra valores mucho mayores que la luz solar. A pesar de las de las diferencias en intensidad, se puede observar como ambos espectros presentan una tendencia similar.

I. 3. LÁMPARAS FLUORESCENTES TUBULARES.

En el caso de experimentación en laboratorio es frecuente el empleo de lámparas fluorescentes ya que la emisión en la franja calorífica es muy inferior (Fig. I. 79) y por tanto se pueden evaluar los efectos de la luz sin aportar calor extra al cultivo. Se evaluaron dos lámparas fluorescentes tubulares muy similares, pero se puede observar como la número dos presenta un máximo menor que la número uno y además unos picos en la zona calorífica muy superiores a los de la número uno.

El consumo energético de este tipo de lámparas es menor pero también lo es su intensidad luminosa. Si se compara con la lámpara incandescente se ve claramente cuán menor es la intensidad aportada por las lámparas fluorescentes (Fig. I. 80).

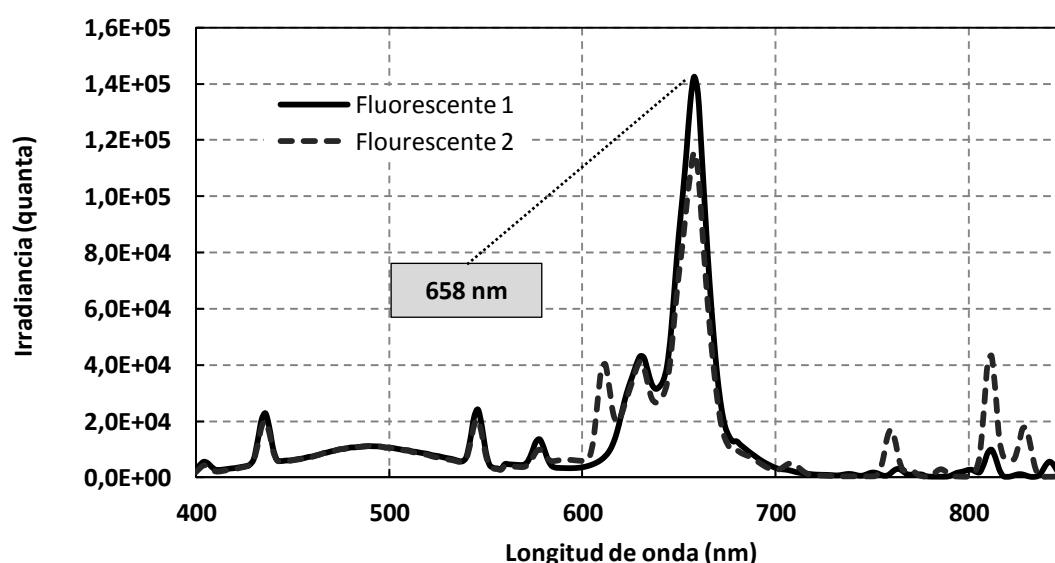


Fig. I. 79. Espectro de emisión de dos lámparas fluorescentes tubulares. En ambos la emisión en la zona calorífica es muy baja, pero el fluorescente número dos presenta una serie de picos en esta parte que el número uno no tiene; además su máximo de intensidad es menor que el del número uno.

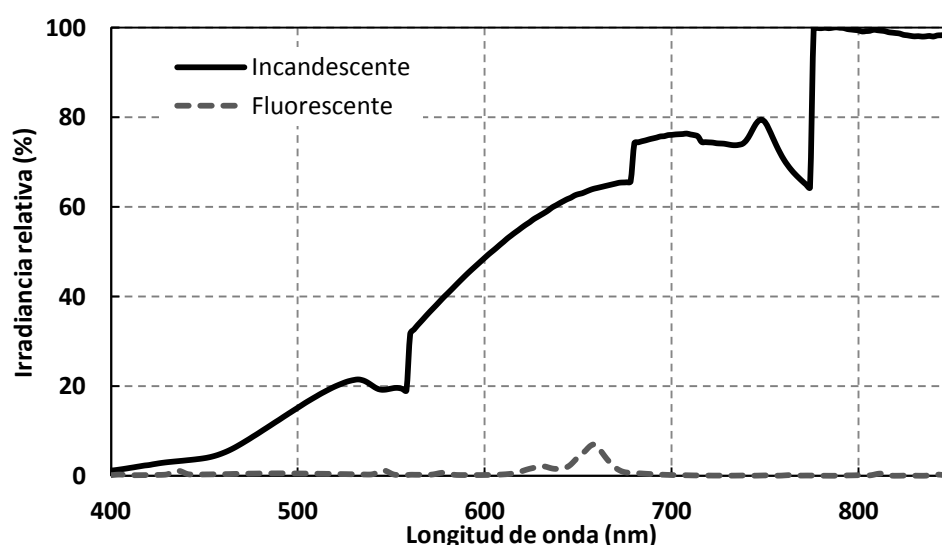


Fig. I. 80. Comparación entre una lámpara incandescente y una fluorescente. La lámpara fluorescente tiene una intensidad muy reducida en comparación con la lámpara incandescente.

I. 4. LIGHT EMITTING DIODES (LEDs).

Los LEDs fueron evaluados teniendo en cuenta las distintas experiencias realizadas, por lo que se hicieron los espectros correspondientes a cada semana de experiencias. Además se hicieron evaluaciones de otras combinaciones de intensidad y de otros LEDs empleados en el Grupo de Agroenergética (GA):

- Rojo 50% (Fig. I. 81).
- Azul 50% (Fig. I. 82).
- Rojo 50% y Azul 50% (Fig. I. 83).
- Rojo 70 % y Azul 30% (Fig. I. 84).
- Rojo 30% y Azul 70% (Fig. I. 85).
- Rojo 100% y Azul 100% (Fig. I. 86).
- Rojo GA (Fig. I. 87).
- Rojo + Azul GA (Fig. I. 88).
- Blanco GA (Fig. I. 89).

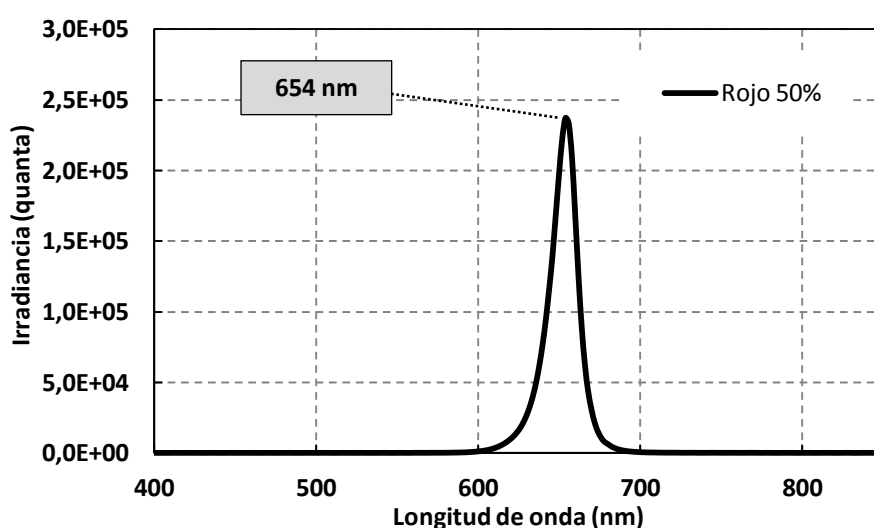


Fig. I. 81. Espectro de emisión del *Light Emitting Diode* (LED) Rojo empleado en la primera experiencia, al 50 % de intensidad.

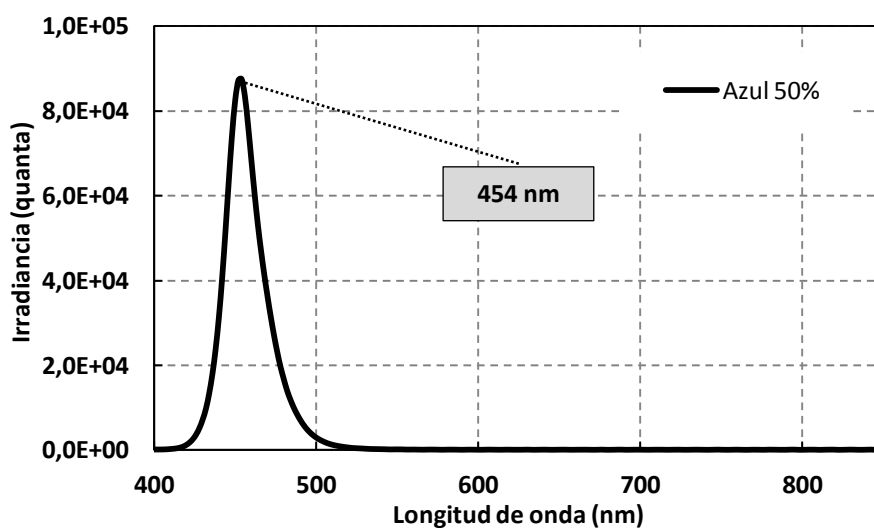


Fig. I. 82. Espectro de emisión del *Light Emitting Diode* (LED) Azul empleado en la segunda experiencia, al 50 % de intensidad.

Cuando se representan juntos el LED rojo y el azul a la misma intensidad (Fig. I. 83) se observa que el LED rojo (654 nm) presenta una irradiancia mucho mayor que el azul (454 nm). En todas las combinaciones de rojo y azul que se llevaron a cabo en las experiencias el LED rojo siempre se presenta valores superiores al LED azul. Aún en el caso en el que el LED azul estaba al 70 % de intensidad y el LED rojo al 30 % la irradiancia del rojo fue superior a la del azul (Fig. I. 85).

Como se puede observar en las figuras, el espectro de emisión que muestran los LEDs es muy concreto, la banda de emisión es muy estrecha y se ciñe a la correspondiente al color que se desea. Debido a esto se usaron LEDs en este ensayo, ya que con estas condiciones se puede evaluar el efecto que provoca la luz de un determinado color en el cultivo sin interferencias de otras franjas de emisión.

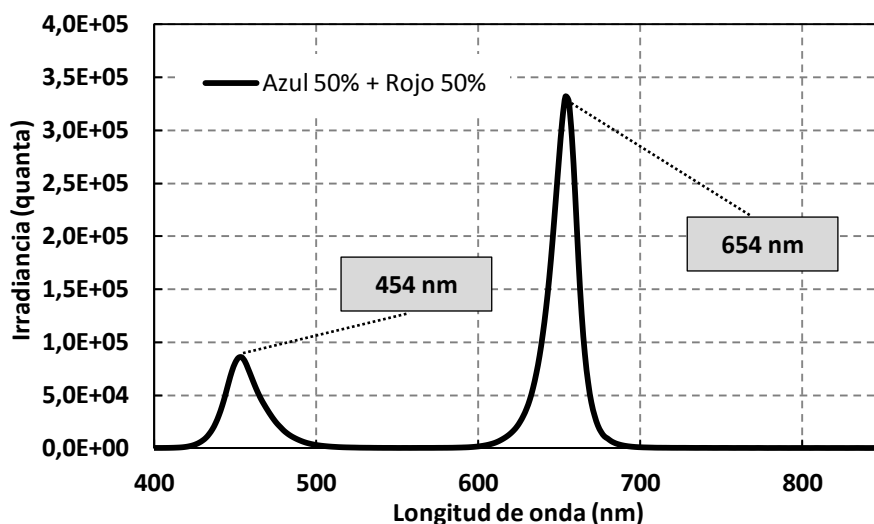


Fig. I. 83. Espectro de emisión de los *Light Emitting Diodes* (LEDs) Rojo y Azul empleados en la tercera experiencia, ambos al 50 % de intensidad.

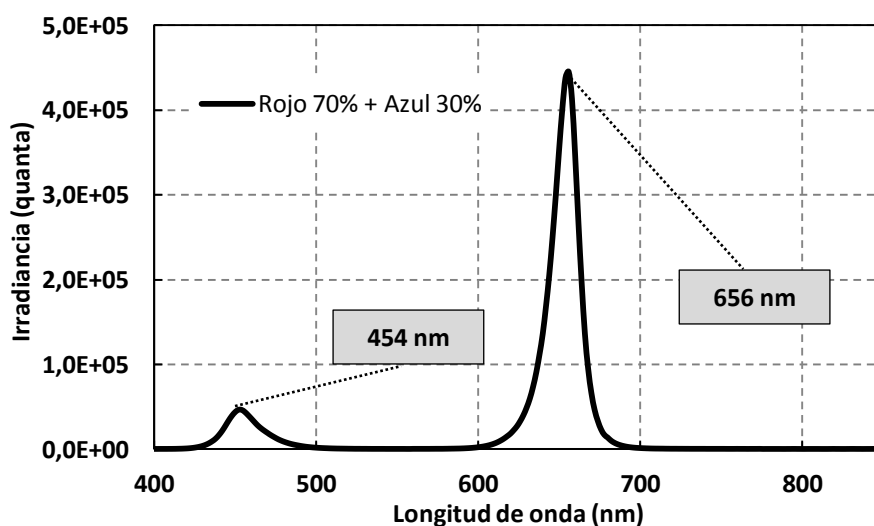


Fig. I. 84. Espectro de emisión de los *Light Emitting Diodes* (LEDs) Rojo y Azul empleados en la cuarta experiencia, al 70 y al 30 % de intensidad respectivamente.

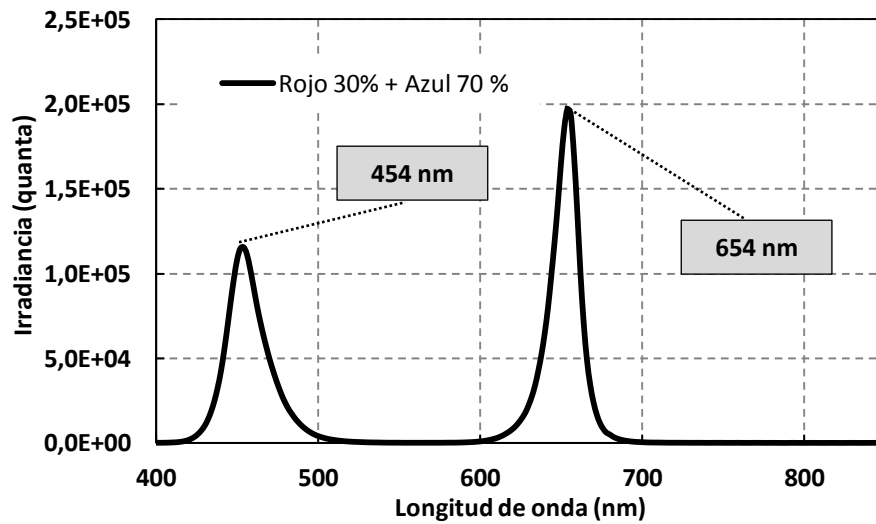


Fig. I. 85. Espectro de emisión de los *Light Emitting Diodes* (LEDs) Rojo y Azul empleados en la quinta experiencia, al 30 y al 70% de intensidad respectivamente.

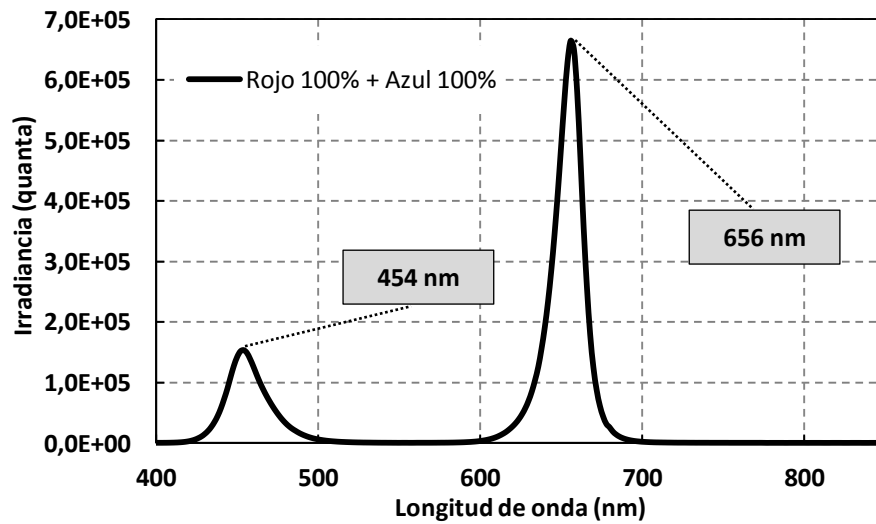


Fig. I. 86. Espectro de emisión de los *Light Emitting Diodes* (LEDs) Rojo y Azul al 100 % de intensidad. Esta combinación no se empleo en ninguna experiencia.

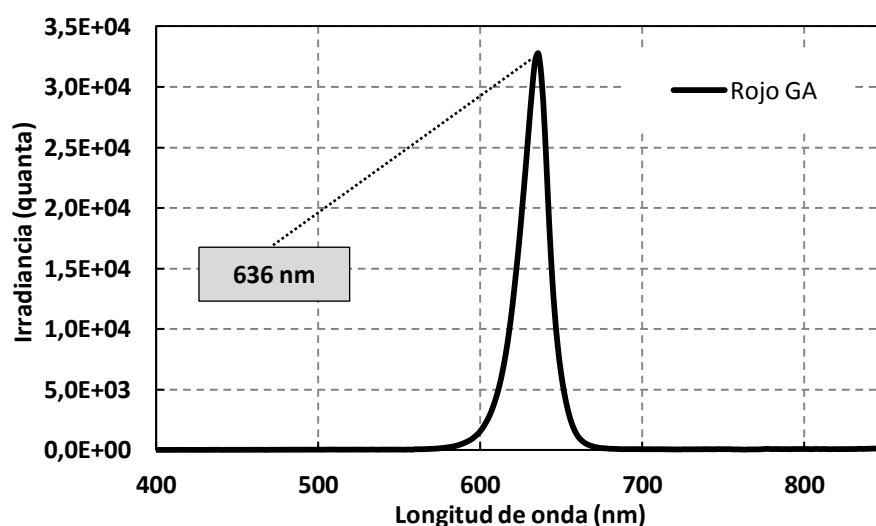


Fig. I. 87. Espectro de emisión del *Light Emitting Diode* (LED) Rojo empleado en el Grupo de Agroenergética (GA).

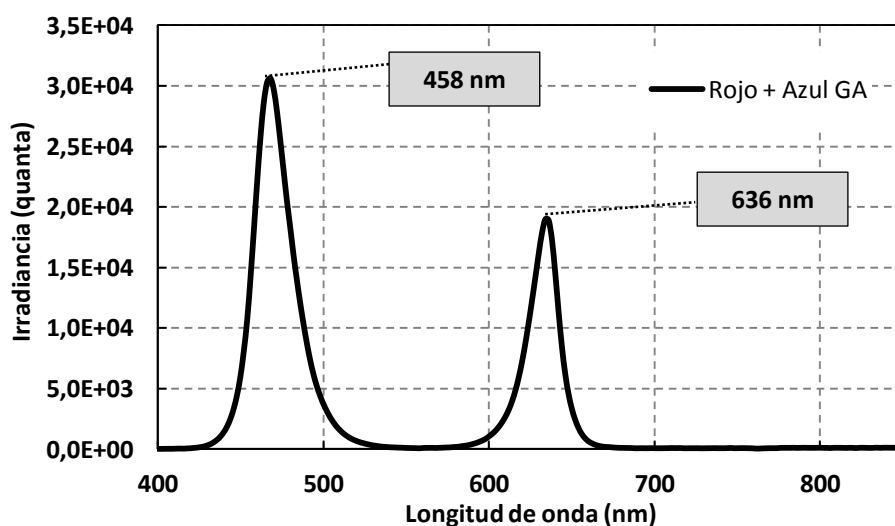


Fig. I. 88. Espectro de emisión del *Light Emitting Diode* (LED) Mixto (Rojo más Azul) empleado en el Grupo de Agroenergética (GA).

En el caso de los LEDs empleados en el Grupo de Agroenergética (GA) se observa que el LED azul (458 nm) muestra una irradiancia superior al LED rojo (636 nm), al contrario que ocurría con los LEDs empleados en el ensayo (Fig. I. 88).

La evaluación del LED de color blanco dio como resultado un espectro de emisión diferente al resto. El espectro del blanco es continuo entre 400 y 750 nm, mostrando picos en las regiones del azul, verde y amarillo (Fig. I. 89) al contrario que el resto de los LEDs en los que el espectro es una banda estrecha registrada en la región correspondiente a su color.

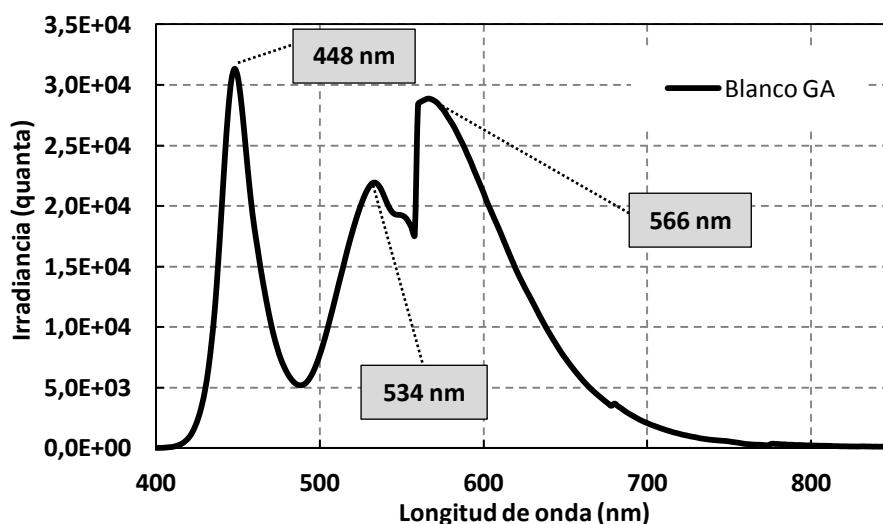


Fig. I. 89. Espectro de emisión del *Light Emitting Diode* (LED) Blanco empleado en el Grupo de Agroenergética (GA).

Los LEDs del Grupo de Agroenergética presentan una intensidad mucho menor a la de los LEDs empleados en el ensayo (Fig. I. 90). En el Grupo de Agroenergética estos LEDs se empleaban sumergidos en el cono del cultivo, por lo que aunque la irradiancia sea menor la luz se está aportando desde el centro del cono del cultivo hacia el exterior, al contrario que en el ensayo en el que la luz ha de recorrer 7,5 cm antes de alcanzar el cultivo.

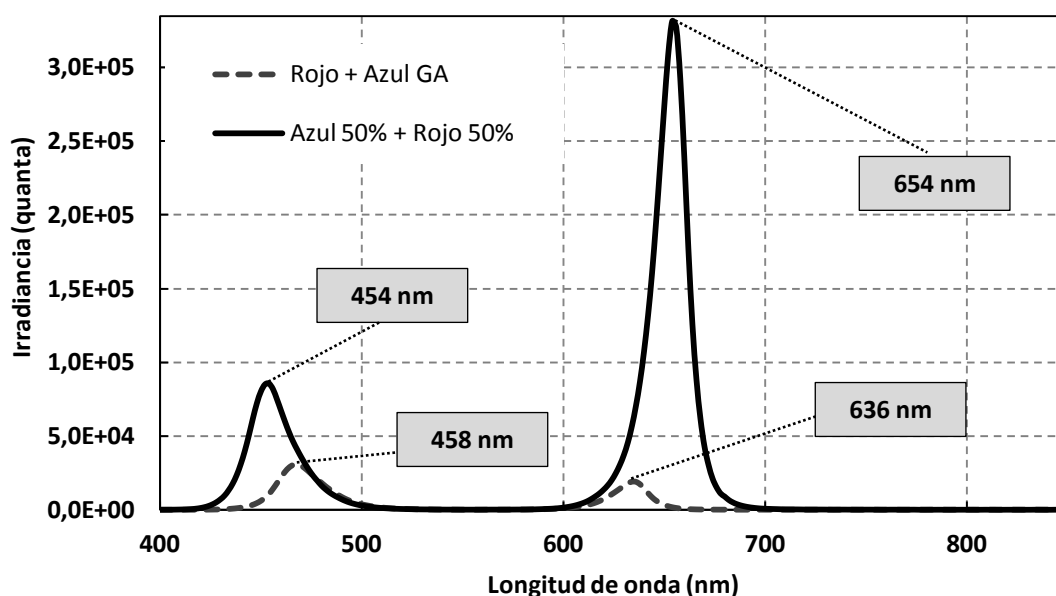


Fig. I. 90. Comparación de los espectros de emisión de los *Light Emitting Diodes* (LEDs) rojo y azul empleados en el ensayo y los utilizados en el Grupo de Agroenergética (GA). Los LEDs del GA presentan valores muy inferiores pero se emplean sumergidos en el cono por lo que la distancia que debe salvar la luz es menor, al contrario que en el ensayo dónde los LEDs están separados del cono 7,5 cm.

Si se compara el espectro de emisión de la lámpara fluorescente empleada en la iluminación del testigo y el espectro de los LEDs rojo y azul al 50 % de intensidad (tercera experiencia), se observa que los LEDs ofrecen niveles de irradiancia superiores a los que otorgan los fluorescentes (Fig. I. 91).

Pero si se compara con el espectro obtenido de la luz incandescente se observa que los LEDs tienen una irradiancia menor, aún cuando son empleados al máximo de su capacidad. En este caso el pico del LED rojo se sitúa al 30 % de la máxima irradiancia obtenida en la lámpara incandescente.

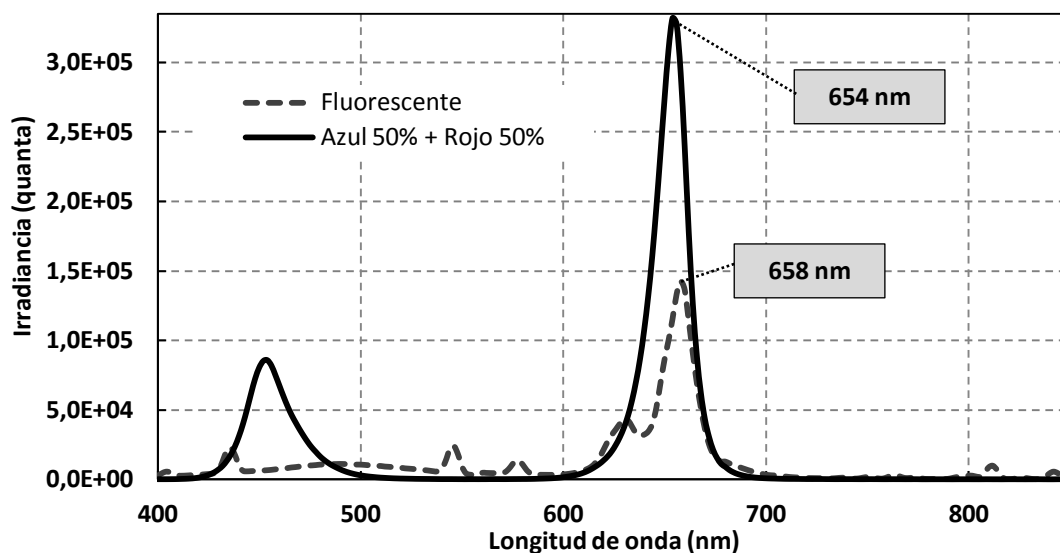


Fig. I. 91. Comparación entre la irradiancia correspondiente a la lámpara fluorescente y la correspondiente a los *Light Emitting Diodes* (LEDs) rojo y azul al 50 % de intensidad.

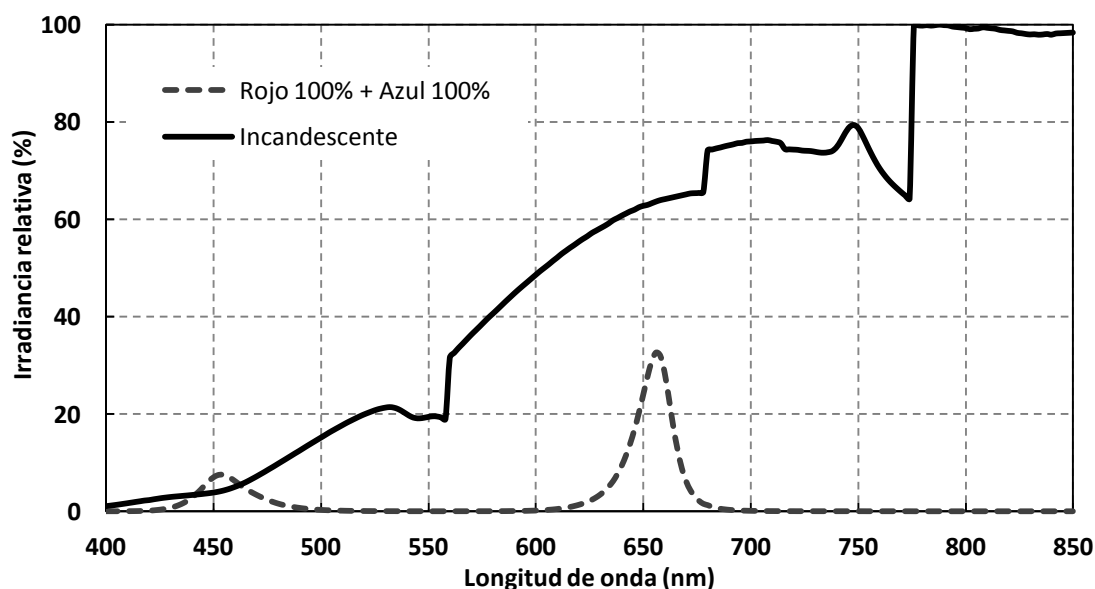


Fig. I. 92. Comparación de espectros de emisión de lámpara incandescente y *Light Emitting Diodes* (LEDs) rojo y azul al máximo de intensidad.

Los LEDs a su máxima intensidad alcanzan valores similares a los de la luz solar en puntos concretos. El pico producido en la región del color rojo, a 656 nm, prácticamente coincide con el de la luz solar en ese mismo punto. Lo mismo ocurre para el caso del pico expresado en la región del azul, a 454 nm; en este caso es incluso ligeramente superior (Fig. I. 93).

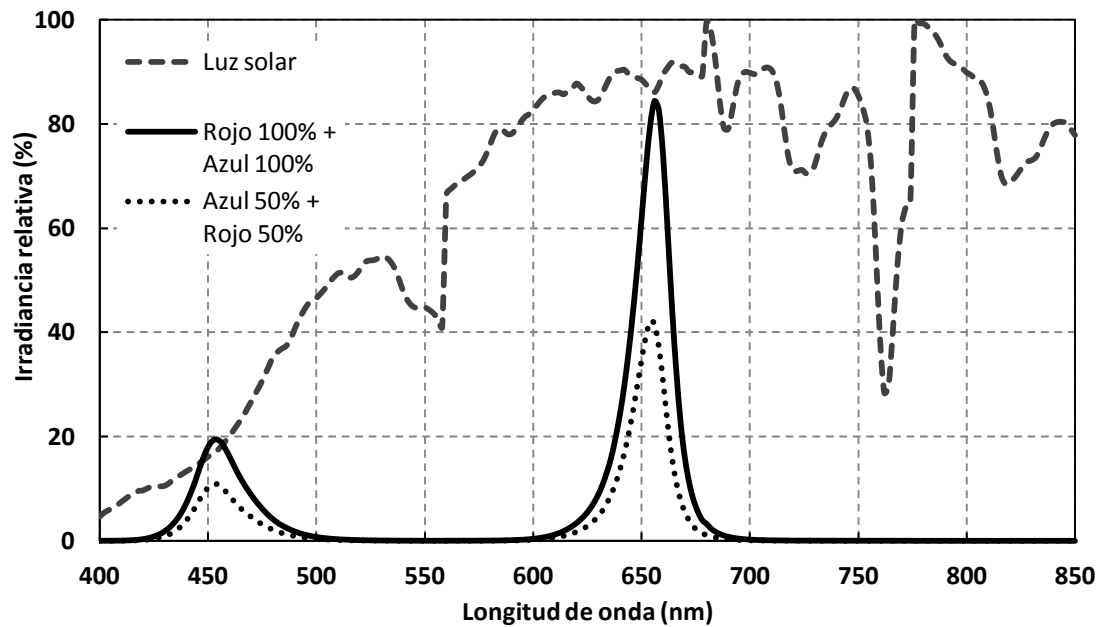


Fig. I. 93. Comparación entre los espectros de la luz solar y los *Light Emitting Diodes* (LEDs) empleados en los ensayos al 50 y al 100 % de intensidad. Cuando los LEDs son aplicados a la máxima intensidad alcanzan valores prácticamente

ANEXO II. RELACIÓN ENTRE LA DENSIDAD ÓPTICA Y EL PESO SECO DE LA BIOMASA OBTENIDA.

La evolución de la densidad óptica a lo largo del cultivo ofrece una idea de cómo evoluciona la biomasa del mismo. Con el fin de conocer de una manera más precisa la cantidad de biomasa que se produce se evaluó la relación que existe entre ambas realizando una recta de calibración.

A partir de una muestra muy concentrada se hicieron alícuotas consecutivas añadiendo porciones variables de la muestra concentrada y de agua destilada. Se elaboraron 16 alícuotas y se midió cada una de sus densidades ópticas (Tabla II. 11). Debido a que la muestra original estaba muy concentrada la medida de la densidad óptica se situó cerca del límite superior del rango de medida del colorímetro por lo que se tuvo que diluir a la mitad para poder tomar la medida. Para no incurrir en errores por diferencia de procedimiento se diluyeron a la mitad todas las alícuotas elaboradas previamente.

Tabla II. 11. Relación de las alícuotas elaboradas para la evaluación de la recta de calibración. De cada alícuota se tomó la medida de su densidad óptica. Debido a que la muestra más concentrada tenía valores de densidad óptica muy elevados (cercanos al límite superior del rango de medida del colorímetro) se tuvo que diluir cada muestra a la mitad con agua destilada para poder realizar la medida.

Algas	:	Agua ¹	DO ²
0,0	:	10,0	0,00
0,5	:	9,5	0,27
1,0	:	9,0	0,48
1,5	:	8,5	0,71
2,0	:	8,0	0,90
2,5	:	7,5	1,17
3,0	:	7,0	1,31
3,5	:	6,5	1,52
4,0	:	6,0	1,63
4,5	:	5,5	1,82
5,0	:	5,0	1,91
6,0	:	4,0	2,15
7,0	:	3,0	2,30
8,0	:	2,0	2,47
9,0	:	1,0	2,60
10,0	:	0,0	2,70

¹ Las proporciones están expresadas en mililitros.

² Los valores de densidad óptica que se muestran son los reales, es decir ya multiplicados por dos.

Desde la situación más concentrada hasta la posición intermedia (5,0:5,0) las alícuotas se hicieron progresivamente a razón de un mililitro, pero a partir de la situación intermedia se procedió a elaborar las

alícuotas a razón de medio mililitro con el fin de afinar más en esta zona en la que la concentración de algas era menor.

Para evaluar el peso seco se tomaron cuatro muestras de la solución más concentrada. Estas muestras se pesaron en balanza de precisión y se centrifugaron durante 20 minutos. Las muestras se centrifugaron tres veces para separar lo máximo posible. Después de cada operación de centrifugación se eliminó el sobrenadante y se tomó la medida del peso húmedo. Antes de introducir de nuevo las muestras en las centrifugas se añadió agua destilada para redissolver la muestra. El sobrenadante procedente de la segunda y tercera centrifuga presentó una ligera coloración verde signo del contenido en pigmentos, por lo que estos dos sobrenadantes se guardaron para ser llevados a estufa y tener en consideración su peso seco. Se juntaron los sobrenadantes de las cuatro muestras de cada proceso de centrifugado en un mismo recipiente para facilitar la medida posterior.

Una vez que acabó el proceso de centrifugación las muestras, éstas y el sobrenadante procedente de la segunda y tercera operación de centrifugación fueron llevadas a estufa durante 24 horas. El valor obtenido del peso seco de los sobrenadantes se dividió entre cuatro y se sumó equitativamente a los resultados obtenidos en cada muestra. Se obtuvo como resultado una media de 1010,84 mg por litro de cultivo (Tabla II. 13). Los valores de las muestras oscilaron entre un mínimo de 941,15 mg/L hasta el valor máximo de 1191,67 mg/L. Los sobrenadantes aportaron una media de 7,5 mg.

El valor de peso seco que se obtuvo se corresponde con la situación más concentrada, cuando la densidad óptica es de 2,70 unidades de absorbancia. El peso seco de las demás alícuotas se calculó en función de éste debido a la complejidad que entrañaría medir el peso seco de las alícuotas en las que la cantidad de algas es muy pequeña, además de que se incurriría en muchos errores por la falta de precisión de las balanzas en ese rango de magnitudes. De este modo el valor del peso seco obtenido se fue multiplicando, para cada alícuota, por la relación alga/agua correspondiente (Tabla II. 12).

Tabla II. 12. Relación del peso seco obtenido en la situación más concentrada con el resto de alícuotas en función de la relación algas/agua que hay en las mismas.

Algas(ml)	:	Agua (ml)	Densidad óptica	Concentración (mg/L)
0,0	:	10,0	0,00	0,00
0,5	:	9,5	0,27	50,54
1,0	:	9,0	0,48	101,08
1,5	:	8,5	0,71	151,63
2,0	:	8,0	0,90	202,17
2,5	:	7,5	1,17	252,71
3,0	:	7,0	1,31	303,25
3,5	:	6,5	1,52	353,79
4,0	:	6,0	1,63	404,34
4,5	:	5,5	1,82	454,88
5,0	:	5,0	1,91	505,42
6,0	:	4,0	2,15	606,50
7,0	:	3,0	2,30	707,59
8,0	:	2,0	2,47	808,67
9,0	:	1,0	2,60	909,76
10,0	:	0,0	2,70	1010,84

Tabla II. 13. Relación de pesos obtenidos en el proceso de elaboración de la recta de calibración. Se muestra la concentración final en función del peso seco obtenido y del volumen inicial de algas.

Tara recipiente (g)	Tara + Algas	Volumen Algas (ml)	PESO SECO Total (g)	Peso seco - Tara (g)	Peso seco (g) Sobrenadante 1	Peso seco (g) Sobrenadante 2	Peso seco NETO (mg)	Concentración (mg/L)
49,74	100	50,26	49,78	0,04	0,0025	0,005	47,5	945,09
49,53	100	50,47	49,57	0,04	0,0025	0,005	47,5	941,15
60,14	100	39,86	60,18	0,04	0,0025	0,005	47,5	1191,67
50,80	100	49,20	50,84	0,04	0,0025	0,005	47,5	965,45
Promedio								1010,84

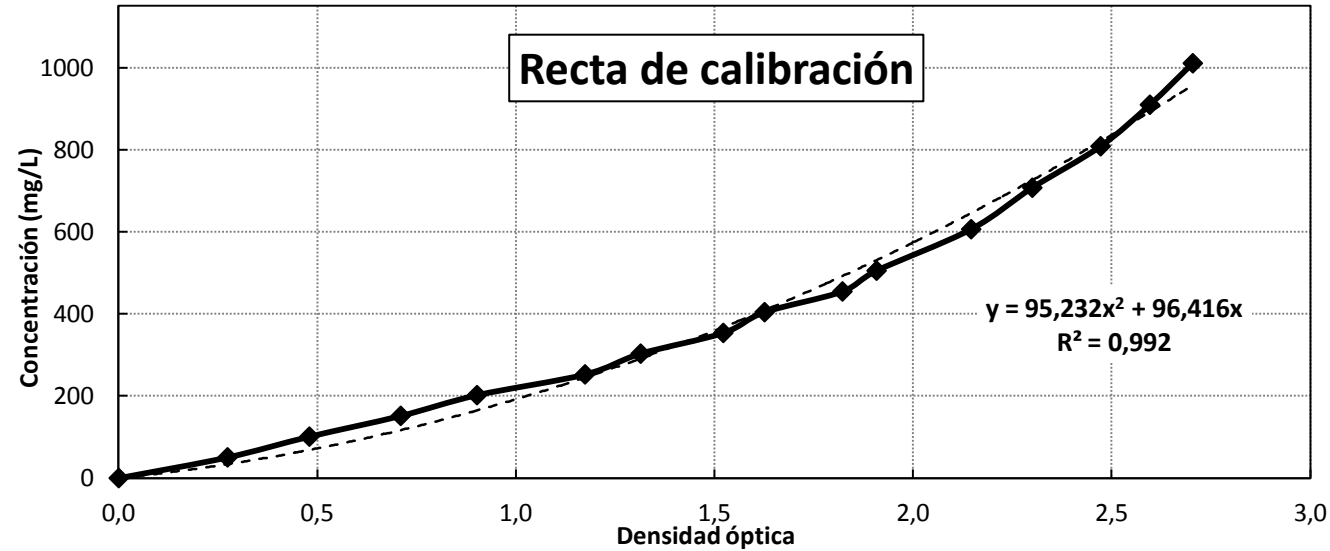


Fig. II. 94. Relación entre el peso seco de la biomasa obtenida y la densidad óptica. Se obtiene una ecuación cuadrática con un alto coeficiente de determinación (R^2).

De la recta de calibración obtenida (Fig. II. 94) se obtuvo la ecuación (Ecuación II. 3) correspondiente a su línea de tendencia. Es una ecuación cuadrática que pasa por el origen de coordenadas y que presenta un alto coeficiente de determinación (R^2). La variable x se corresponde con la densidad óptica y la variable y con la concentración en mg/L de biomasa. De este modo conociendo la densidad óptica (entre 0 y 2,7 unidades de absorbancia) se puede conocer la concentración de biomasa.

$$y = 95,23 x^2 + 96,42 x$$

Ecuación II. 3. Relación entre la densidad óptica (variable x) y la concentración (variable y) obtenida a partir de la línea de tendencia descrita por los valores representados en la Fig. II. 94. Ecuación válida para valores de densidad óptica entre 0 y 2,7 unidades de absorbancia.

Si tenemos en cuenta solo los valores de densidad óptica comprendidos entre 0 y 1,5 unidades de absorbancia (Fig. II. 95), obtenemos una recta de regresión lineal con un índice R^2 ligeramente superior al índice de la cuadrática anterior.

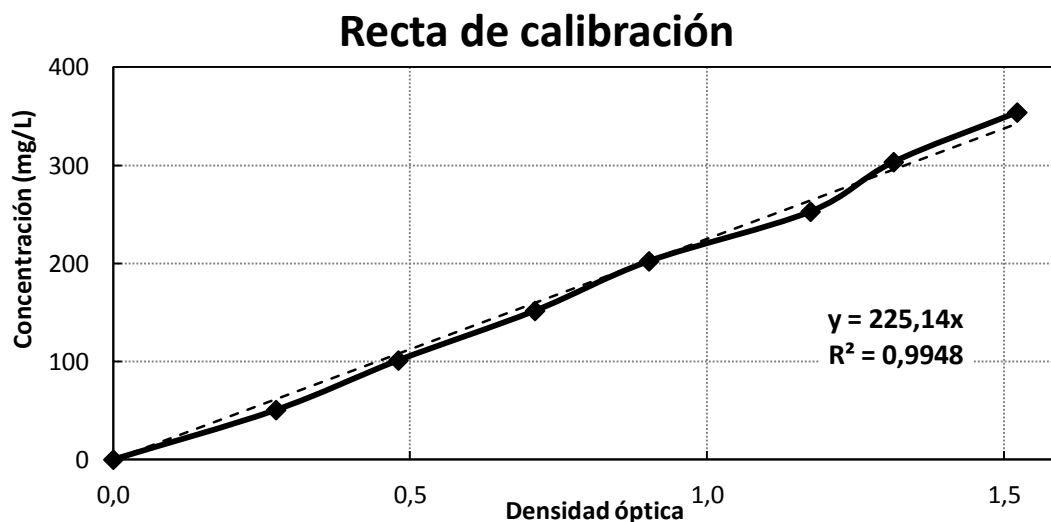


Fig. II. 95. Recta de calibración en el caso de que solo se contemplen valores de densidad óptica comprendidos entre 0 y 1,5 unidades de absorbancia.

$$y = 225,14 x$$

Ecuación II. 4. Relación entre la densidad óptica (variable x) y la concentración (variable y) en mg/L cuando los valores de densidad óptica se encuentran entre 0 y 1,5 unidades de absorbancia.

Con esta ecuación lineal (Ecuación II. 4) se podría trabajar de manera más sencilla en este rango de valores de densidad óptica, que por otro lado fueron los más frecuentes en las experiencias del ensayo. El hecho de que la relación entre la concentración y la densidad óptica sea lineal con un alto grado de regresión, implica que habrá una relación directa entre los valores de densidad óptica dentro del rango indicado y la concentración. Cuando los valores de densidad óptica superen ese rango la relación dejará de ser directa y se tendrá que emplear otra ecuación o diluir las muestras para incluirlas dentro del rango anteriormente descrito.

